



## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 C12N 15/57, 9/54, 1/21, C11D 3/386	A1	(11) 国際公開番号 WO99/18218  (43) 国際公開日 1999年4月15日(15.04.99)
(21) 国際出願番号 PCT/JP98/04528 (22) 国際出願日 1998年10月7日(07.10.98) (30) 優先権データ 特願平9/274570 1997年10月7日(07.10.97) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 花王株式会社(KAO CORPORATION)[JP/JP] 〒103-8210 東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番10号 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ) 高岩美喜雄(TAKAIWA, Mikio)[JP/JP] 奥田光美(OKUDA, Mitsuyoshi)[JP/JP] 佐伯勝久(SAEKI, Katsuhisa)[JP/JP] 久保田浩美(KUBOTA, Hiromi)[JP/JP] 影山 泰(KAGEYAMA, Yasushi)[JP/JP] 〒321-3497 栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株式会社 研究所内 Tochigi, (JP) 人見 潤(HITOMI, Jun)[JP/JP] 〒314-1103 茨城県鹿島郡神栖町東深芝20 花王株式会社 研究所内 Ibaraki, (JP)		四方資通(SHIKATA, Shitsuw)[JP/JP] 野村昌史(NOMURA, Masafumi)[JP/JP] 〒640-8580 和歌山県和歌山市湊1334 花王株式会社 研究所内 Wakayama, (JP) (74) 代理人 弁理士 有賀三幸, 外(ARUGA, Mitsuyuki et al.) 〒103-0013 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番6号 共同ビル Tokyo, (JP) (81) 指定国 AU, CN, ID, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書 明細書とは別に規則13の2に基づいて提出された生物材料の寄託に関する表示
(54) Title: ALKALINE PROTEASE (54) 発明の名称 アルカリプロテアーゼ (57) Abstract An alkaline protease having the following properties; a gene encoding the same; a microorganism producing the same; and washing compositions containing the same: (i) acting over a broad pH value range of 4 to 13 and achieving, at pH 6 to 12, an activity 80 % or more as high as the one at the optimum pH value; (ii) when treated at 40 °C for 30 minutes, being stable over a pH value range of 6 to 11; (iii) having an isoelectric point of about 8.9 to 9.1; and (iv) being free from inhibition by oleic acid on the casein digesting activity. Because of being highly stable to various surfactants, being tolerant to fatty acids and showing a high stability to oxidizing agents, this alkaline protease is useful as an enzyme to be used in cleansers for automatic dish washers and a detergent for clothes, both containing bleaching components.		

(57)要約

本発明は、次の性質を有するアルカリプロテアーゼ、これをコードする遺伝子、これを産生する微生物及びこれを含む洗浄剤組成物に関する。

(i) pH 4 ~ 13 の広い範囲で作用し、pH 6 ~ 12 で最適pH活性値の80%以上を示す；(ii) 40℃、30分の処理条件でpH 6 ~ 11 の範囲で安定である；(iii) 等電点8.9 ~ 9.1 付近；(iv) オレイン酸によってカゼイン分解活性の阻害を受けない。

このアルカリプロテアーゼは、各種の界面活性剤に極めて安定であり、脂肪酸耐性を有し、かつ酸化剤にも高い安定性を有することから、漂白剤成分を含有する自動食器洗浄機用洗剤及び衣料用洗浄剤用の酵素として有用である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール
AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	ML	マリ	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
CA	カナダ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	US	米国
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	VN	ヴェトナム
CH	スイス	IN	インド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CI	コートジボアール	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CM	カメルーン	IT	イタリア	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CN	中国	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CU	キューバ	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CY	キプロス	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CZ	チェコ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KR	韓国	RU	ロシア		
DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
EE	エストニア	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		

## 明 細 書

## アルカリプロテアーゼ

## 技術分野

本発明は洗浄剤配合用酵素として有用なアルカリプロテアーゼ、それをコードする遺伝子、該アルカリプロテアーゼを産生する微生物及び該アルカリプロテアーゼを含有する洗浄剤組成物に関する。

## 背景技術

プロテアーゼは、衣料用洗剤をはじめとする各種洗浄剤、化粧品、浴用剤、食品改質剤、消化助剤あるいは消炎剤といった医薬品等の多分野で利用されてきた。

その中でも最も大量に工業生産され市場規模が大きいのは洗剤用プロテアーゼであり、例えばアルカラーゼ、サビナーゼ（ノボ・ノルディスク社製）、マクサカル（ジェネンコア社製）、ブラップ（ヘンケル社製）及びプロテアーゼK（KAP；花王社製）などが知られている。

一方、現在もより性能の向上した洗剤用酵素の探索が試みられており、熱及び界面活性剤に対する安定性の高い酵素（特開平6-70765号公報等）、ケラチンなどの不溶性蛋白質に作用しかつ高い比活性を有する酵素（特開平9-121855号公報等）、低温域での活性に優れた酵素（特開平5-211868号公報、特開平9-121856号公報等）及び酸化剤に対する安定性を向上させる方法（欧州特許第0130756号公報）等が開示されている。

ところで、衣料等の汚れは蛋白質だけでなく、脂質、固体粒子など複数の成分が含まれていることがほとんどであり、かかる実際の複合汚れに対して洗浄力の

高い洗浄剤が望まれている。これに対しては、通常複数種の酵素、複数種の界面活性剤の配合がなされている。

しかしながら、複数種の酵素を配合したところで、その配合した個々の酵素が複合汚れの条件下で安定で、かつ十分な活性を維持していなければ、その作用は充分に発揮されない。この点で従来の酵素は必ずしも十分ではなかった。

#### 発明の開示

本発明者は、高濃度の脂肪酸存在下でもカゼイン分解活性を保持し、蛋白だけでなく皮脂等の汚れのある複合汚れ条件下でも優れた洗浄性を有するアルカリプロテアーゼを見出した。

すなわち、本発明は、下記の理化学的性質を有するアルカリプロテアーゼを提供するものである。

##### (i) 作用pH範囲：

pH 4 ～ 13 の広い範囲で作用し、pH 6 ～ 12 で最適pH活性値の80%以上を示す。

##### (ii) 安定pH範囲：

40℃、30分の処理条件でpH 6 ～ 11 の範囲で安定である。

##### (iii) 等電点：

8.9 ～ 9.1 付近。

##### (iv) 脂肪酸の影響：

オレイン酸によってカゼイン分解活性の阻害を受けない。

また、本発明は、上記アルカリプロテアーゼをコードする遺伝子を提供するものである。

また、本発明は、上記アルカリプロテアーゼを産生する微生物を提供するものである。

さらに本発明は、上記アルカリプロテアーゼを含有する洗浄剤組成物を提供す

るものである。

#### 図面の簡単な説明

図1は、アルカリプロテアーゼKP43のpHプロファイルを示す。図2は、アルカリプロテアーゼKP43のpH安定性(40℃、30分)を示す。図3は、アルカリプロテアーゼKP43のpH安定性(10℃、24時間)を示す。図4は、アルカリプロテアーゼKP43の温度プロファイルを示す。図5は、アルカリプロテアーゼKP43の耐熱性を示す。図6は、KP43プロテアーゼの酸化剤(50mM過酸化水素)に対する安定性を示す。図7は、KP9860プロテアーゼ及びその部分分解物のN末端配列を示す。図8は、KP9860プロテアーゼのN末端配列からデザインしたプライマー配列を示す。図9は、57bp PCR増幅断片とプライマーデザインを示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明のアルカリプロテアーゼは、前記(i)～(iv)の理化学的性質を有するが、特に(iv)の性質は重要である。すなわち、オレイン酸は皮脂の成分の一つであり、オレイン酸10mM存在下でも、オレイン酸不存在下の場合と同等のカゼイン分解活性を保持している。

本発明のアルカリプロテアーゼとしては、(v)SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE)による推定分子量が約43,000のものが好ましい。

さらに、上記(i)～(v)の性質以外に下記(vi)～(ix)の性質を有するアルカリプロテアーゼが特に好ましい。

(vi) 作用温度及び最適温度：

作用最適温度は60℃～70℃であるが、20℃以下の低温でも作用する。

(vii) 金属イオンの影響：

Hg<sup>2+</sup>及びCu<sup>2+</sup>イオンでは活性が阻害され、Ca<sup>2+</sup>イオンでは熱安定性が向上する。

(viii) 阻害剤の影響：

エチレンジアミン四酢酸(EDTA)及びp-クロロマーキュリー安息香酸(PCMB)では活性は阻害されないが、ジイソプロピルフルオロリン酸(DFP)及びフェニルメタンサルホニルフルオリド(PMSF)では活性は阻害される。

(ix) 界面活性剤耐性：

直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム、ポリオキシエチレンアルキル硫酸ナトリウム、ドデシル硫酸ナトリウム、 $\alpha$ -オレフィンスルホン酸ナトリウム及び $\alpha$ -スルホ脂肪酸エステルで活性は阻害されない。

本発明のアルカリプロテアーゼとしては、配列番号1又は2に示すアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の1若しくは2以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有するものが好ましい。配列番号1と2とは、配列番号2における3位リジンが配列番号1では欠失している点で異なるのみである。配列番号1及び2におけるXaaは、任意のアミノ酸を示すが、各位置のXaaの好ましいアミノ酸を配列番号2における位置で下記の表に示す。

---

24位	Ser又はAsn	30位	Gly又はAsp
33位	Asn又はThr	47位	Ala又はVal
48位	Lys又はSer	54位	Gly又はArg
71位	Pro又はLeu	75位	Gln又はLeu
90位	Ile又はVal	103位	Gln又はLys
106位	Lys又はThr	129位	Lys又はGln
131位	Ala又はLys	132位	Thr又はVal
133位	Ser又はArg	134位	Thr又はSer
147位	Ile又はLys	149位	Arg又はLys
161位	Glu又はThr	166位	Val又はLeu
173位	Lys又はAsn	184位	Gln又はGlu
188位	Phe又はTyr	189位	Ala又はVal
190位	Ile又はAla	195位	Leu又はHis
287位	Ser又はAla	307位	Gly又はSer
325位	Tyr又はPhe	370位	Gly又はArg
432位	Phe又はTyr	502位	Ile又はVal
532位	Ser又はAla	542位	Ser又はThr
585位	Gln又はArg	592位	Thr又はSer
593位	Ser又はAla	595位	Tyr又はPhe
596位	Asn又はAsp	597位	Asp又はAsn
612位	Ala又はSer	633位	Thr又はAsn

---

本発明アルカリプロテアーゼにおける前記欠失、置換又は付加は、アルカリプロテアーゼ活性を失わない限り特に制限されないが、配列番号1又は2で示されるアミノ酸配列の好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好

ましくは90%以上が保存されているものが好ましい。

本発明のアルカリプロテアーゼの具体例としては、配列番号3、4又は5で示されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の1若しくは2以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有するアルカリプロテアーゼが挙げられる。

本発明のアルカリプロテアーゼは、例えばバチルス属 (*Bacillus*) に属するアルカリプロテアーゼ生産菌を培養し、その培養物から採取することにより製造することができる。ここで、本発明アルカリプロテアーゼ生産菌としては、バチルス属に属する野生株、及び前記のアミノ酸配列を有するペプチドをコードする遺伝子を有する形質転換体が挙げられる。また、該野生株としては例えばK P 4 3 株、K P 1 7 9 0 株及びK P 9 8 6 0 株が挙げられる。これらの菌株の菌学的性質を以下に示す。



表 1

	KP43	KP1790	KP9860
A. 形態学的性質			
(a) グラム染色	陽性	陽性	陽性
(b) アミノペプチダーゼ	不定	不定	不定
(c) 運動性	有する	有する	有する
(d) 鞭毛	周鞭毛	周鞭毛	周鞭毛
(e) 孢子 (有無、形、位置、膨らみ)	有孢子、楕円形、中央、無し	有孢子、楕円形、中央、無し	有孢子、楕円形、端～中央、有り
B. 生理学的性質			
(a) 硝酸塩の還元	陰性	陰性	陰性
(b) インドール生成	陰性	陰性	陰性
(c) 生育のpH範囲	pH 6.2 ~ pH 11.7 で生育、pH 8 ~ pH 10 で良好に生育。	pH 6.2 ~ pH 11.7 で生育、pH 8.5 ~ pH 10 で良好に生育。	pH 6.2 ~ pH 10.0 で生育、pH 9 付近で良好に生育。
(d) 塩化ナトリウムに対する耐性	7% 以上 NaCl 含有培地上で生育できない。	7% 以上 NaCl 含有培地上で生育できない。	7% 以上 NaCl 含有培地上で生育できない。
(e) 生育の温度範囲	10 ~ 40 °C	10 ~ 40 °C	20 ~ 40 °C
(f) $\beta$ -ガラクトシダーゼ	陽性	陽性	陽性
(g) アルギニンジヒドロラーゼ	陰性	陰性	陰性
(h) リジンジヒドロラーゼ	陰性	陰性	陰性
(i) オキシダーゼ	陽性	陽性	陽性
(j) クエン酸の利用	陰性	陰性	陰性
(k) 尿素の利用	陰性	陰性	陰性
(l) カタラーゼ	陽性	陽性	陽性
(m) グルコース及び硝酸塩からのガスの生成	陰性	陰性	陰性
(n) 嫌気条件下での生育	陰性	陰性	陰性
(o) VP テスト	陰性	陰性	陰性
(p) 糖からの酸生成			
D-グルコース	+	±	+
L-アラビノース	-	-	-
D-キシロース	-	-	-
D-マンニトール	+	+	+
D-ガラクトース	±	±	±
シュークロース	+	+	+
D-マンノース	+	±	+
イノシトール	-	-	-
D-ソルビトール	+	-	-
トレハロース	±	±	±
ラクトース	-	-	-
グリセロール	-	-	-
マルトース	+	±	+
D-フラクトース	+	+	+
ラフィノース	-	-	-
メリビオース	+	-	-
でんぷん	+	+	-

以上の菌学的性質について「Bergey's Manual of Systematic Bacteriology」(Williams & Wilkins社、1984年)の記載に準じ検討したところ、上記の3菌株はバチルス属に属させることが妥当である。しかし、種については、既知のバチルス属の種の諸性質とは完全に一致しないことから新規な微生物である。そこで上記3菌株を工業技術院生命工学技術研究所(あて名：〒305-0046日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号)にバチルス エスピー (*Bacillus sp.*) KSM-KP43 (FERM BP-6532)、バチルス エスピー (*Bacillus sp.*) KSM-KP1790 (FERM BP-6533)、バチルス エスピー (*Bacillus sp.*) KSM-KP9860 (FERM BP-6534)として寄託した(原寄託日：1996年9月18日)。

上記の菌株を用いて本発明アルカリプロテアーゼを生産するには、菌株を資化性の炭素源、窒素源その他の必須栄養素を含む培地に接種し、常法に従い培養すればよい。

かくして得られた培養液中からのアルカリプロテアーゼの採取及び精製は、一般の酵素の採取及び精製方法に準じて行うことができる。例えば、培養液から遠心分離又は濾過することで菌体を除き、培養上清液から常法の精製手段により目的酵素を得る。このようにして得られる酵素液は、そのまま用いることもできるがさらに公知の方法により精製、結晶化することもできる。

本発明アルカリプロテアーゼは、該アルカリプロテアーゼをコードする遺伝子を取得し、これを用いて組換えベクターを作製し、該組換えベクターを用いて宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養し、培養物からアルカリプロテアーゼを採取することによっても得られる。

本発明アルカリプロテアーゼ遺伝子は、例えば上記3菌株からクローニングすることができる。該クローニング手段としては、既知の手段、例えば(1)適当な制限酵素による染色体DNAの全分解又は部分分解で得られたDNA断片を適当なベクターに組み込み、大腸菌や枯草菌などに導入し発現させるショットガン法、(2)適当なプライマーを合成してPCR法で目的とする遺伝子をクローニ

ングする方法等が挙げられる。

本発明アルカリプロテアーゼ遺伝子の塩基配列の一例を配列番号 3～5 に示す。該塩基配列は、配列番号 3～5 に限定されるものではなく、配列番号 1 若しくは 2 に示されたアミノ酸配列をコードする塩基配列、又は該アミノ酸配列の 1 若しくは 2 以上のアミノ酸が欠失し、置換若しくは付加したアミノ酸配列をコードする塩基配列であればよいが、配列番号 3～5 で示される塩基配列、又は該塩基配列の 1 若しくは 2 以上の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を有するものが好ましい。ここで欠失、置換若しくは付加は、前記アミノ酸配列の変異の範囲内であることが好ましい。

前記アルカリプロテアーゼ遺伝子を含む組換えベクターを作製するには、目的とする宿主内で遺伝子を発現するのに適した任意のベクターにアルカリプロテアーゼ遺伝子を組み込めばよい。かかるベクターとしては、大腸菌を宿主とする場合、pUC18、pBR322、pUC19 等が挙げられ、枯草菌を宿主とする場合、pUB110 等が挙げられる。

かくして得られた組換えベクターを用いて宿主を形質転換するには、常法、例えばプロトプラスト法、コンピテントセル法等により行われる。宿主としては、特に制限されないが、微生物が好ましく、バチルス属細菌等のグラム陽性菌；大腸菌 (*Escherichia coli*) 等のグラム陰性菌；サッカロマイセス属酵母、アスペルギルス属カビ等の真菌等が挙げられる。

得られた形質転換体を培養して本発明アルカリプロテアーゼを採取するには、例えば前記の野生株を用いた培養、採取、精製の手段に準じればよい。

本発明のアルカリプロテアーゼは、前記の如く優れたアルカリ耐性を有し、脂質の存在下でも優れたプロテアーゼ活性を有し、さらに酸化剤に対する耐性及び界面活性剤耐性を有するので、各種洗浄剤組成物配合用酵素として有用である。

洗浄剤組成物中への上記アルカリプロテアーゼの配合量は、アルカリプロテアーゼが活性を示す量であれば特に制限されないが、洗浄剤組成物 1 kg 当たり

0. 1～5 0 0 0 U、特に1～5 0.0 Uが好ましい。

また、本発明のアルカリプロテアーゼ含有洗浄剤組成物には、公知の洗浄剤成分を配合することができ、当該公知の洗浄成分としては、WO 94/26881の第5頁、右上欄、第14行～右下欄、第29行記載のものを使用することができる。

界面活性剤は、洗浄剤組成物中0. 5～60重量%（以下単に%で示す）配合され、特に粉体状洗浄剤組成物については10～45%、液体洗浄剤組成物については20～50%配合することが好ましい。また、本発明洗浄剤組成物が漂白洗浄剤又は自動食器洗浄機用洗浄剤である場合、界面活性剤は一般に1～10%、好ましくは1～5%配合される。

二価金属イオン捕捉剤は、0. 01～50%、好ましくは5～40%配合される。

アルカリ剤及び無機塩は0. 01～80%、好ましくは1～40%配合される。

再汚染防止剤は0. 001～10%、好ましくは1～5%配合される。

本発明のアルカリプロテアーゼ以外にセルラーゼ、アミラーゼ、プロトペクチナーゼ、ペクチナーゼ、リパーゼ、ヘミセルラーゼ、 $\beta$ -グリコシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ等を使用することができる。これらの酵素は0. 001～5%、好ましくは0. 1～3%配合される。

漂白剤（例えば過酸化水素、過炭酸塩等）は1～10%配合するのが好ましい。漂白剤を使用するとき漂白活性化剤（アクチベーター）を0. 01～10%配合することができる。

蛍光剤はビフェニル型蛍光剤（例えばチノパールCBS-X）やスチルベン型蛍光剤（例えばDM型蛍光染）等が挙げられる。蛍光剤は0. 001～2%配合するのが好ましい。

上記の洗浄剤組成物の形態は、例えば液体、粉末、顆粒等とすることができる。また、この洗浄剤組成物は、衣料用洗浄剤、自動食器洗浄機用洗浄剤、排水管洗

浄剤、糞菌洗浄剤、漂白剤等として使用することができる。

## 実施例

### 実施例 1 (アルカリプロテアーゼ生産菌のスクリーニング)

土壌サンプル 1 g を生理食塩水 (10 mL) に懸濁し、80℃で10分間熱処理を行った後、以下に示した組成を有するプロテアーゼ生産菌液体集積培地へ接種し、20℃で培養を行った。3回程度同培地で植え継ぎ集積を行った後、以下に示した組成を有するプロテアーゼ生産判定プレートに塗抹し、20℃で5～7日間培養した。生育した集落の周囲にスキムミルクの分解によって生じた透明帯を指標としてプロテアーゼ生産菌を分離した。その結果、アルカリプロテアーゼ生産菌としてバチルス エスピー KSM-KP 43 株、KSM-KP 1790 株及び KSM-KP 9860 株を得た。

表 2

スクリーニング用液体集積培地 (pH 11) の組成	
リン酸一カリウム	0.1%
硫酸マグネシウム	0.02%
酵母エキス (ディフコ社製)	0.05%
ケラチン (東京化成社製)	1.0%
グルコース	0.5%
炭酸ナトリウム	0.3%
スクリーニング用寒天平板培地	
ニュートリエントアガー (ディフコ社製)	2.3%
スキムミルク (ディフコ社製)	0.3%
炭酸ナトリウム	1.0%

### 実施例 2

得られたバチルス エスピー KSM-KP 43 株をポリペプトン S 1%、酵母

エキス 0.05%、リン酸 1 カリウム 0.1%、硫酸マグネシウム 0.02%、グルコース（別滅菌）1%、炭酸ナトリウム（別滅菌）0.5%、の組成の液体培地に接種し 30℃、24 時間培養した。この時の培養上清の酵素濃度は、約 1.5 U/L であった。この培養液を 4℃ で遠心分離し得られた培養上清に攪拌しながら粉碎した硫酸を 90% 飽和濃度になるように添加した。攪拌しながら 4℃ で一昼夜放置後遠心分離により沈殿を回収し、得られた沈殿を 5 mM の塩化カルシウムを含む 10 mM トリスー塩酸緩衝液 pH 7.5 に溶解し、同緩衝液に対して透析した。続いてこの透析内液を 5 mM の塩化カルシウムを含む 10 mM トリスー塩酸緩衝液 pH 7.5 で平衡化させた DEAE-Sephacel FF（ファルマシア社製）カラムを通過させ非吸着画分を回収した。この回収液を 2 mM 塩化カルシウムを含む 50 mM HEPES 緩衝液 pH 7.5 に対して透析し、同緩衝液で平衡化させた SP-セファロース FF カラムを通過させ非吸着画分よりやや遅れて溶出してくる活性画分を回収した。活性回収率 15% のこのサンプルを用いて SDS ポリアクリルアミド電気泳動を行ったところ単一バンドとして検出された。

### 実施例 3

得られたバチルス エスピー K SM-KP 1790 株及び K SM-KP 9860 株を実施例 2 と同様の培地で培養し、実施例 2 と同様に培養液を精製してアルカリプロテアーゼを採取した。

### 実施例 4

実施例 2 及び 3 で得られたアルカリプロテアーゼの酵素学的性質を検討した。その実験方法及び結果を以下に示す。

#### 1. 実験材料及び実験方法

##### (1) 活性測定法

##### (a) カゼイン法

1% (w/v) カゼイン（ハマーStein：メルク社製）を含む 50 mmol/L 各種緩衝液 1 mL を 40℃ で 5 分間保温した後、0.1 mL の酵素溶液を添加し、

40℃で10分間反応を行った。TCA溶液(0.11mol/Lトリクロロ酢酸:0.22mol/L酢酸ナトリウム:0.33mol/L酢酸)2mLを添加して反応を停止し、室温で10分間放置した後、酸変性蛋白を濾過(No.2濾紙:ホワットマン社製)した。そして、濾液0.5mLにアルカリ性銅試薬(1%(w/v)酒石酸カリウム・ナトリウム:1%(w/v)硫酸銅:2%(w/v)炭酸ナトリウム、0.1mol/L水酸化ナトリウム=1:1:100(v/v))2.5mLを添加し、30℃、10分間保温した後、希釈フェノール試薬(フェノール試薬(関東化学社製)をイオン交換水で2倍希釈したもの)0.25mLを加え、30℃、30分間保温した後、660nmにおける吸光度を測定した。上記の酵素反応系に反応停止液を混合した後、酵素溶液を加えた系をブランクとした。

なお、酵素1単位(P.U)は、上記の反応条件において1分間に1mmolのチロシンに相当する酸可溶性蛋白分解物を遊離する酵素量とした。

#### (b) 合成基質法

0.9mLの100mmol/Lホウ酸緩衝液(pH10.0, 2mmol/L塩化カルシウム含有)に50mmol/L合成基質溶液(サクシニル-Lアラニル-Lフェニル-Lロイシン・パラニトロアニライドをジメチルスルホキシドに溶解)0.05mLを混合し、30℃で5分間保温した後、0.05mLの酵素溶液を加え、30℃、10分間反応を行った。5%(w/v)クエン酸溶液2mLを添加して反応を停止させ、420nmにおける吸光度を測定した。

なお、酵素1単位(U)は、上記の反応条件において1分間に1μmolのp-ニトロアニリンを遊離させるのに必要な酵素量とした。

#### (c) アンソン・ヘモグロビン法

アンソンの方法に従い(M. L. Anson, J. Gen. Physiol. 22, 79(1938))、尿素を用いて牛血清ヘモグロビンを変性させ、水酸化ナトリウムにてpH10.5とした。この基質溶液(ヘモグロビンとして2.2%)0.5mLに酵素液0.1mL( $1.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-3}$  A.U)を添加し25℃にて10分間反応を

行い、4. 9%のトリクロル酢酸1. 0 mLを加え、反応を停止した。反応終了後、遠心分離(3, 000 rpm, 10分)を行い、その上清液中に含まれる蛋白分解物をフォーリン・ローリー法(O. H. Lowryら、J. Biol. Chem., 193, 265(1951))によって定量した。

なお、酵素1単位(A. U)は、上記の反応条件において1分間に1 mmoleのチロシンに相当する酸可溶性蛋白分解物を遊離する酵素量とした。

#### (2) 至適pH

カゼイン1% (w/v)を含む50 mmol/Lのブリットン・ロビンソン緩衝液1 mLに酵素溶液( $3.0 \times 10^{-5}$  m P. U) 0. 1 mLを加え、カゼイン法によって活性測定を行った。

#### (3) pH安定性

ブリットン・ロビンソン緩衝液(20 mmol/L、2 mmol/L塩化カルシウム含有)中に酵素溶液を( $8.0 \times 10^{-4}$  m P. U.)混合し、40°C、30分間及び10°C、24時間の処理を行った。この処理液を氷冷後、50 mmol/Lホウ酸緩衝液で40倍に希釈した後、カゼイン法により残存活性を測定した。

#### (4) 至適温度

カゼイン1% (w/v)を含有する50 mmol/Lホウ酸緩衝液(pH 10. 0) 1 mL中に、酵素溶液( $2.0 \times 10^{-5}$  m P. U.) 0. 1 mLを添加し、10~80°Cまでの各温度でカゼイン法により活性測定を行った。

なお、活性測定は5 mmol/L塩化カルシウムの存在下及び非存在下の両系において行った。

#### (5) 耐熱性

20 mmol/Lホウ酸緩衝液(pH 10. 0)中、5 mmol/L塩化カルシウムの存在下及び非存在下の両系において、酵素溶液( $2.5 \times 10^{-4}$  m P. U.)を加え、各温度で10分間熱処理を行った。氷冷後、50 mmol/Lホウ酸緩衝液(pH 10. 0)で5倍希釈し、カゼイン法により残存活性の測定を行った。



#### (6) 金属イオンの影響

1 mmol/L 各種金属塩を含む 20 mmol/L ホウ酸緩衝液 (pH 10.0) 中に酵素溶液 ( $4.0 \times 10^{-4}$  mP. U.) を添加し、30°C、20 分間の処理を行った。その後、50 mmol/L ホウ酸緩衝液 (pH 10.0) で 5 倍希釈し、カゼイン法により活性の測定を行った。

#### (7) 阻害剤の影響

10 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) に各種阻害剤を所定濃度になるよう調製し、酵素溶液 ( $1.0 \times 10^{-3}$  mP. U.) を添加し、30°C、20 分間の処理を行った。その後、イオン交換水で 20 倍希釈し、カゼイン法により残存活性の測定を行った。

#### (8) 界面活性剤の影響

1% の界面活性剤を溶解した 100 mmol/L ホウ酸緩衝液に、酵素溶液 ( $7.0 \times 10^{-4}$  mP. U.) を添加し、40°C、4 時間の処理を行った。その後、50 mmol/L ホウ酸緩衝液 (pH 10.0) で 20 倍希釈し、カゼイン法により残存活性の測定を行った。

#### (9) 酸化剤 (過酸化水素) の影響

過酸化水素及び塩化カルシウムを含むブリットン・ロビンソン緩衝液 (最終濃度: 50 mmol/L 過酸化水素、2 mmol/L 塩化カルシウム、20 mmol/L ブリットン・ロビンソン (pH 8.0)) 2.7 mL を 30°C、15 分間保温した後、0.3 mL の酵素溶液を添加した。経時的に、予め準備しておいた 5  $\mu$ L のカタラーゼ (ベーリンガー・マンハイム社製: 20 mg/mL) 入り試験管に 0.8 mL サンプルを添加し、酸化反応を停止させた。そして、各サンプルを 2 mmol/L 塩化カルシウムで適当に希釈した後、合成基質法を用いて残存活性を測定した。

#### (10) 脂肪酸の影響

1% (w/v) カゼインを含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7) を基質溶液として、0~10 mL のオレイン酸ナトリウム存在下で 20°C、15 分間反応を行い、カゼ

イン法で活性測定を行った。

## 11. 実験結果

### (1) 至適pH

3種類のプロテアーゼ (KP43, KP1790, KP9860) に及ぼすpHの影響を検討した。至適pHにおける活性を100%とし、各pHでのKP43の相対活性を図1に示した。その結果、いずれのプロテアーゼも、作用最適pHはpH6～12にあり、非常に広いpH領域において高い蛋白分解活性を有することが明らかになった。

### (2) pH安定性

処理前の酵素活性を100%とし、40℃で30分間及び10℃で24時間の保存後の、各pHにおけるKP43の残存活性を図2及び3に示した。その結果、40℃、30分間の処理では、いずれもpH6～12の広範囲で安定であり、カルシウムイオンの添加によってpH5における安定性も改善されることが明らかになった。一方、10℃、24時間の処理では、いずれもpH5～12の広範囲で安定であった。

### (3) 至適温度

基質にカゼインを用いて、各々のプロテアーゼに及ぼす温度の影響を検討した。カルシウム無添加系における最高活性を100%とし、各温度におけるKP43の相対活性を図4に示した。この結果から、カルシウムイオン無添加系においては、3種類のプロテアーゼは至適温度を60℃に有することが判った。また、カルシウムイオン添加系によっていずれも至適温度は70℃となり、既存の洗剤用プロテアーゼと同様、カルシウムイオン添加系による至適温度の高温側への移行が認められた。

### (4) 耐熱性

30～60℃までの各温度で (pH10.0、5mmol/L塩化カルシウム添加及び無添加系)、10分間の熱処理を行い、残存活性を測定した。未処理時の活性を100%とし、各処理温度におけるKP43の残存活性を図5に示す。その結

果、いずれのプロテアーゼも塩化カルシウム無添加系においては、60℃まで安定であり、塩化カルシウム（5 mmol/L）の添加により温度安定性は10℃程高温側にシフトすることが明らかになった。市販の洗剤用酵素と比較した場合、最も耐熱性に優れているエスペラーゼに匹敵する耐熱性を保持するものと考えられた。

#### （5）金属イオンの影響

4種類のプロテアーゼについて、各種金属塩（1 mmol/L）で20 mmol/L ホウ酸緩衝液中（pH 10）、30℃、20分間の処理を行い、残存活性を測定した。残存活性は、金属塩無添加系で同様の処理を行った時の酵素活性を100%とする相対値で表わした（表3参照）。その結果、いずれのプロテアーゼも塩化水銀及び硝酸銀による阻害が認められたが、他の各種金属塩に対しては、非常に安定であることが判った。

表 3

金属塩 (1 mM)	相 対 活 性 (%)		
	KP43	KP1790	KP9860
無添加	100	100	100
AgNO <sub>3</sub>	66	70	45
NiCl <sub>2</sub>	92	95	96
CaCl <sub>2</sub>	97	95	101
CoCl <sub>2</sub>	91	101	98
FeCl <sub>3</sub>	93	113	96
ZnCl <sub>2</sub>	85	94	91
CuCl <sub>2</sub>	91	96	94
HgCl <sub>2</sub>	38	37	33
MgCl <sub>2</sub>	92	103	100

処理条件：1 mM金属塩、20mMホウ酸緩衝液(pH10.0)30℃、20分

#### (6) 各種阻害剤の影響

一般的な酵素阻害剤が本発明プロテアーゼに対して与える影響を検討した。10 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) に各種阻害剤を所定濃度になるように添加し、30℃、20分間の処理を行い、残存活性を測定した。残存活性は、阻害剤無添加系で同様の処理を行った時の酵素活性を100%とする相対値で表わした(表4参照)。この結果から明らかなように、3種類のプロテアーゼはいずれも、セリンプロテアーゼの阻害剤であるジイソプロピルフルオルリン酸(DFP)、フェニルメタンスルホニルフルオライド(PMSF)及びキモスタチンで阻害されることから、活性中心にセリン残基を有するプロテアーゼであると考えられた。また、放線菌由来でセリンプロテアーゼの阻害作用が報告されているアンチパインやロイペプチンによる影響は認められなかった。

表 4

阻 害 剤	残 存 活 性 (%)			
	濃度 (mM)	KP43	KP1790	KP9860
無添加	—	100	100	100
EDTA	5	110	97	101
EGTA	5	92	91	90
o-フェナントロリン	5	100	103	100
DTT	5	104	102	105
PCMB	1	125	115	126
NEM	5	97	100	100
DFP	1	14	17	16
PMSF	1	0	0	0
キモスタチン	0.1	87	87	80
アンチパイン	0.1	103	99	97
ロイペプチン	0.1	102	101	93
E-64	0.1	104	99	103
エラストチナール	0.1	99	102	102

EDTA : エチレンジアミン 4 酢酸 (シグマ社製)

EGTA : エチレングリコール 4 酢酸 (シグマ社製)

DTT : ジチオスレイトール (シグマ社製)

PCMB : p-クロロマーキュリ安息香酸 (シグマ社製)

NEM : N-エチルマレイミド (シグマ社製)

DFP : ジイソプロピルフルオルリン酸 (シグマ社製)

PMSF : フェニルメタンスルホニルフルオリド (シグマ社製)

#### (7) 界面活性剤の影響

各種プロテアーゼを0.1 mol/L トリス-塩酸緩衝液 (pH 9.0) 中、1% の各種界面活性剤で40℃、4時間の処理を行い、残存活性を測定した。残存活性は、処理時間0分での酵素活性を100%とする相対値で表わした (表5参照)。その結果、3種類の酵素は、直鎖アルキルベンゼンスルホン酸 (LAS) をはじめとする界面活性剤に非常に安定であることから、界面活性剤を含有する洗浄剤成分として有用であると考えられた。

表 5

界面活性剤 (濃度: 1%)	残 存 活 性 (%)		
	KP43	KP1790	KP9860
無添加	100	100	100
直鎖アルキルベンゼン スルホン酸ナトリウム (LAS)	100	88	100
ポリオキシエチレンアルキル 硫酸ナトリウム (ES)	101	102	104
ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)	104	97	103
$\alpha$ -オレフィンスルホン酸 ナトリウム (AOS)	100	111	100
アルキル硫酸ナトリウム (AS)	113	107	107
$\alpha$ -スルホ脂肪酸エステル ( $\alpha$ -SFE)	112	113	105
ソフタノール 70 H	109	109	104

処理条件: 1% 界面活性剤、100mM ホウ酸緩衝液 (pH 10.0)  
40℃、4 時間処理

#### (8) 酸化剤の影響

各種プロテアーゼを50 mmol/L 過酸化水素を含むブリットン・ロビンソン緩衝液 (pH 8.0) 中30℃で処理を行い、経時的に残存活性を測定した。図6に示すように、3種の酵素は市販洗剤用酵素のサビナーゼやKAPを大きく上回る安定性を示し、蛋白工学的手法を用いてサビナーゼに酸化剤耐性を付与したデュラザイム (ノボ・ノルディスク社製) 並の優れた安定性を示した。

## (9) 脂肪酸の影響

結果を表6に示すように、本発明アルカリプロテアーゼは、皮脂の成分の一つであるオレイン酸10mMの存在下で活性を全く失わなかった。

表 6

脂肪酸存在下での相対活性 (%)					
	オレイン酸濃度 (mM)				
	0	1	2	5	10
KP43プロテアーゼ	100	100	100	103	119
KP1790プロテアーゼ	100	100	100	108	121
KP9860プロテアーゼ	100	100	100	100	106

## 実施例5 (KP9860プロテアーゼ遺伝子のクローニング)

## (1) KSM-KP9860株ゲノムDNAの調製法

KSM-KP9860株を液体培地(0.5%グルコース、0.2%ポリペプトン-S、0.05%酵母エキス、0.1% $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.26% $\text{NaCO}_3$ : pH9.0) 500mLで30℃、2日間培養した後、遠心分離により菌体を回収した。得られた菌体から、SaitoとMiuraらの方法(Biochim. Biophys. Acta. 72, 619(1963))らの方法によりゲノムDNAを調製した。

## (2) KP9860プロテアーゼの部分分解と分解産物の回収

## 1) 熱失活によるKP9860プロテアーゼの変性

KP9860プロテアーゼ (5mg/mL)	45 $\mu$ L
PMSF (100mM)	20 $\mu$ L
EDTA (200mM)	10 $\mu$ L
SDS (0.08mg/mL)	25 $\mu$ L

上記の組成のプロテアーゼ溶液を沸騰水中で10分間加熱した。プロテアーゼ溶液を2mM酢酸アンモニウムで透析し、SDS、EDTA、PMSFを除いた

後、凍結乾燥した後、 $100\mu\text{L}$ の蒸留水に溶解し、変性蛋白サンプルとした。

## 2) トリプシンによる部分分解

変性蛋白サンプル	$100\mu\text{L}$
トリプシン ( $1\mu\text{g}/\text{mL}$ , Sigma)	$100\mu\text{L}$
$1\text{M}$ Tris-HCl (pH 7.5)	$50\mu\text{L}$
蒸留水	$750\mu\text{L}$

トリプシンを1) で得られた変性蛋白サンプルに対して、上記の組成で氷中で3時間作用させた。反応の停止はSDS ( $0.08\text{mg}/\text{mL}$ )、EDTA ( $200\text{mM}$ )、PMSF ( $100\text{mM}$ ) をそれぞれ $300\mu\text{L}$ 、 $100\mu\text{L}$ 、 $200\mu\text{L}$ 加え、沸騰水中で3分間加熱することで行った。

$2\text{mM}$  酢酸アンモニウムで透析し、SDS、EDTA、PMSFを除いた後、凍結乾燥した後、 $100\mu\text{L}$ の蒸留水に溶解し、SDS-PAGE用のサンプルとした。

## 3) 部分分解物の回収

2) で得られたサンプルをレディゲル-J (Bio-Rad 社製)  $12\%$ で電気泳動し、Quick CBB染色液 (Bio-Rad 社製) で染色し蛋白バンドを検出した。蛋白バンド部分を剃刀で切り出し、 $1.5\text{mL}$ チューブ内で破碎後、5倍量のSDS-PAGE泳動バッファー (組成はグリシン $14.4\%$  (W/V)、Trisは $3.03\%$ 、SDS (Bio-Rad 社製)  $10\%$ ) を加え、室温で攪拌し蛋白バンドを溶出させた。得られた溶出液を $2\text{mM}$  酢酸アンモニウムで透析、凍結乾燥して、プロテインシーケンサー (Protein Sequencer 476A型: Applied Biosystem 社製) を用いた解析に供した。

得られた部分分解物のN末端配列を図7に示す。

## (3) PCR

増幅すべきDNA領域のそれぞれの+鎖、-鎖の5'末端に相当する20~30塩基数のプライマー (図8) を合成し、鋳型DNA  $100\text{ng}$ 、プライマー20



pmolを用いてPwoDNA polymerase (Boehringer mannheim 社製)を用いて100  $\mu$ Lの反応系でPCR反応を行った。また、インバースPCRを行う場合はExpand<sup>TM</sup>long template PCR system (Boehringer mannheim 社製)を用いて50  $\mu$ Lの反応系で行った。図8に示したプライマーである9860-N2と9860-25k-RVを用いたPCRにより、527bpのDNA断片を取得した。

#### (4) PCR産物のサブクローニング

PCR産物をHigh pure PCR product purification kit (Boehringer mannheim 社製)を用いて精製した後、pUC18のSma IサイトにLigation kit ver. 2 (Takara社製)を用いて16°C、一夜反応により挿入した。得られた組換えプラスミドとコンピテントセルE. coli JM109株 (Takara社製)を混合し、42°C、45秒間のヒートショックを与え、E. coli JM109株を形質転換した。菌液にLBを加え、37°Cで1時間保温した後に、IPTG (0.1mM、Sigma) 及びX-gal [0.004% (w/v)、Sigma]、アンピシリン (50  $\mu$ g/mL、Sigma) を含有するLBプレートに塗布した。37°Cで一夜培養し、生育したホワイトコロニーを組換えプラスミドが導入された形質転換体として選抜した。

#### (5) 塩基配列の決定

形質転換体をアンピシリン50  $\mu$ g/mLを含有したLBで37°Cで一夜培養し、菌体を遠心分離により回収後、High pure plasmid isolation kit (Boehringer mannheim 社製)組換えプラスミドを得た。得られた組換えプラスミド1  $\mu$ gを鋳型として、プライマーとDNA Sequencing kit (PERKIN ELMER 社製)を用いて20  $\mu$ Lの反応系でPCR反応を行った。反応生成物をQuick spin column (Boehringer mannheim社製)を用いて精製した後に、遠心エバポレーターで乾燥させ、DNA Sequencer 377型 (Applied Biosystem 社製)を用いた解析に供した。

PCRによって得られたDNA断片は、KP-9860プロテアーゼのN末端配列に一致するアミノ酸配列を有し、サブチリシン等のアルカリプロテアーゼとの活性中心を構成する3つのアミノ酸(Asp、His、Ser)の内、AspとHis周辺の共通配列と考えられる配列が認められたことから、KP-9860プロテアーゼ遺伝子の一部分であると考えられた。

#### (6) サザンハイブリダイゼーション

KP9860染色体をEcoRI、SacI、KpnI、HindIII、BamHI、XhoI、PstI、BglIIを用いて処理し、得られた527bp DNAをプローブにサザンハイブリダイゼーションを行い、相間性領域の検出を試みた。

その結果、KpnIを除く各々のレーンでハイブリダイズするバンドが認められた。

#### (7) インバースPCR

得られた527bpの配列から作製したプローブ1~4(図9)を用いてインバースPCRを行った。KP-9860染色体を制限酵素EcoRI、HindIII、PstI、BglIIによる完全消化を行い、各々Ligation Kit ver.2(Takara社製)処理をキットに従って行った。得られた反応液をエタノール沈殿させ、インバースPCR用鋳型DNAとした。EcoRI、HindIII、PstI、BglII制限酵素処理インバースPCR用鋳型DNA 0.1  $\mu$ g、プライマー1及び4各10 p molとExpand long template PCR systemを用いて、PCR反応(条件:(94 $^{\circ}$ C 10秒、60 $^{\circ}$ C 30秒、68 $^{\circ}$ C 4分)10サイクル、(94 $^{\circ}$ C 10秒、60 $^{\circ}$ C 30秒、68 $^{\circ}$ C 4分+20 $\times$ サイクル数)20サイクル、68 $^{\circ}$ C 7分、4 $^{\circ}$ C 1分)を行った。又、EcoRI制限酵素処理インバースPCR用鋳型DNA 0.1  $\mu$ g、プライマー2及び3各10 p molとExpand long template PCR systemを用いて、PCR反応(条件:同上)を行った。得られた増幅DNA断片をHigh Pure PCR Product Purification Kitを用いて精製後、DNA blunting Kit(Takara社製)を用いて末端を平滑化した。得られたDNA断片と制限酵素

SmaI 処理した pUC18 とを混合し、キットに従って Ligation Kit ver.2 処理を行った。得られた、処理反応液を用いて大腸菌 JM109 株をコンピテンスセル法を用いて形質転換し、組換えプラスミドを取得した。得られた組換えプラスミドに挿入された DNA 断片を上記に従ってシーケンスし、塩基配列の決定を行った。

#### (8) KP-9860 プロテアーゼ遺伝子の全塩基配列の解析

シーケンスの結果、KP-9860 プロテアーゼ遺伝子には 1917 bp、639 アミノ酸残基をコードする Open Reading Frame (ORF) が存在し、ORF 中には精製酵素の N 末端配列に一致する領域が存在した (NDVARHIVKADVAQSSYGLY)。N 末端配列から、成熟型プロテアーゼは 1302 bp、434 アミノ酸残基と推定された (配列番号 3、分子量 45310Da)。また ORF の上流にはプロモーター領域 (-35 領域: ttgtgt、-10 領域: tacgat) 及びリボソーム結合部位 (SD 配列: aggagt) と推定される配列が認められた。終止コドン (taa) の下流にはターミネーターと推定される、-26.2 kcal/mol の自由エネルギーを有するインバーテッド・リピートが存在した。

実施例 5 と同様にして、KP-43 プロテアーゼ及び KP-1790 プロテアーゼのそれぞれの遺伝子の全塩基配列及びアミノ酸配列を解析した。その結果を配列番号 4 及び 5 に示す。

#### 実施例 6

##### 洗浄試験:

JIS K 3371 に準じ洗浄試験を行った。洗浄系は、表 7 記載の配合組成から成る洗剤を 71.2 mg CaCO<sub>3</sub>/L (4°DH) の水にて使用濃度に溶解後、各種のプロテアーゼをアンソン・ヘモグロビン法で 40 mAPU/L となるようにそれぞれ添加した (表 8 参照)。

試験布は、ワイシャツの衿部分 (3 日間着用) とし、一対比較ができるように 8 × 8 cm 程に裁断後、酵素添加、あるいは酵素無添加の洗浄系にてターゲットメー

ター（上島製作所製）を使用し、15℃、100rpmで10分間洗浄を行った。濯ぎ、乾燥後、一对の衿布（15組）を見比べ汚れ落ちの程度を肉眼で判定した。判定方法は、汚れがほぼ完全に落ちている場合を5点、汚れがほとんど落ちていない場合を1点とし、15枚の衿布の合計評価点を求め、酵素無添加の洗浄系による評価点を100とした場合の比率を洗浄力指数として表した。この結果を表8に示す。

表 7

(重量%)

成分 (%)	洗剤A	洗剤B	洗剤C
LAS	23.0	4.0	20.0
AS	4.0		
AE	5.0		
AEP		5.0	
AES		20.0	
脂肪酸塩	3.0	2.5	2.0
ゼオライト	22.0		20.0
炭酸ナトリウム	15.0		
炭酸カリウム	3.0		
非晶質珪酸塩	7.0		7.0
結晶性珪酸塩	4.0		
亜硫酸ナトリウム	2.0	0.5	2.0
硫酸ナトリウム	2.0		23.0
AA-MA	5.0		
クエン酸			10.0
PEG	2.0		2.0
モノエタノールアミン		8.0	
エタノール		5.0	
水分	3.0	残部	7.0
形態	粒状	液状	粒状
使用濃度	20g/30L	20g/30L	40g/30L
洗濯後のpH	10.7	9.2	8.0

LAS：直鎖アルキル（ $C_{12-14}$ ）ベンゼンスルホン酸ナトリウム  
（液体洗剤は酸型で配合）

AS：ドデシルアルコール硫酸エステルナトリウム

AE：ポリオキシエチレン라우リルエーテル（EO平均付加モル数4）

AEP：ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンラウリルエーテル  
(EO平均付加モル数 8、PO平均付加モル数 3)

AES：ポリオキシエチレンアルキル (C<sub>10-12</sub>) エーテル硫酸ナトリウム  
(EO平均付加モル数2.5)

脂肪酸：ヤシ油由来脂肪酸ナトリウム

ゼオライト：4A型ゼオライト、平均粒径 3 μm

炭酸ナトリウム：デンス灰

非晶質珪酸塩：JIS 2号珪酸ナトリウム

結晶性珪酸塩：SKS-6 (ヘキストクヤマ社製) 粉碎品、  
平均粒径 15 μm

AA-MA：ソカラNC P5、アクリル酸-マレイン酸共重合体  
(BASF社製)

PEG：ポリエチレングリコール、平均分子量 8,000

表 8

	プロテアーゼ	洗浄力指数
		洗剤 A
本発明品 1	<i>Bacillus</i> sp. KSM-KP43(実施例 2)	106
本発明品 2	<i>Bacillus</i> sp. KSM-KP1790(実施例 3)	106
本発明品 3	<i>Bacillus</i> sp. KSM-KP9860(実施例 3)	105
比較品 1	Savinase 12.0T type White® (ノボルディスク社製)	103.5
比較品 2	Durazyme 6.0T® (ノボルディスク社製)	103.5
比較品 3	なし	100

表 8 より、活性が同じ条件であっても、本発明品を配合した洗浄剤 (洗剤 A) は、従来のプロテアーゼ配合洗浄剤より優れた洗浄力を有することが分かる。本発明品の優れた洗浄効果は、同様に、洗剤 B 及び洗剤 C でも得られる。

実施例 7

表 9 に示す組成の洗浄剤 1 0 0 重量部に、実施例 2 又は 3 で得られた *Bacillus* sp. KSM-KP43、KSM-KP1790 又は KSM-KP9860 由来の本発明プロテアーゼ精製標品から特開昭 6 2 - 2 5 7 9 9 0 号公報記載の方法に基づき調製した造粒物 (6 A P U / g) を 1 重量部配合して本発明の洗浄剤組成物を調製した。なお、粒状洗浄剤の場合には、酵素、P C、A C - 1、A C - 2 を除いた成分で粒子化した洗剤生地に、酵素、P C、A C - 1、A C - 2 をそれぞれ粒子化したものをブレンドすることにより製造した。各洗浄剤を 7 l、2 mg C a C O<sub>3</sub> / L (4 ° D H) の水にて使用濃度に溶解後、実施例 6 と同様にして衿布を洗浄した。得られた洗浄剤は優れた洗浄力を有し、衣料用洗浄剤として有用である。

表 9

成 分 (%)	本 発 明 品									
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
LAS-2	20		20.5		12				5	10
LAS-3		15								
AS-2			5		10		20			
SAS	3									
AOS		3								
SFE		8								
脂肪酸塩	2	6	4	10	3	3	2	1.5		
AES-2								20		
AE-3	3									10
AE-4		3	3	15		15	3		15	
AE-5							2	20	20	25
AG									5	7
ゼオライト	30	18	15	15		10	20			
吸油性担体				10		12				
結晶性珪酸塩				20						
非晶質珪酸塩	12	1	8		10		5			
STPP					25.5	20				
炭酸ナトリウム	10	27	25	10	10	15	17.5	0.1		
炭酸カリウム		3		2	5					
亜硫酸ナトリウム	2	2			1			0.2	0.2	0.2
硫酸ナトリウム	4.5	1.5		1	11	8	10			
クエン酸ナトリウム			4	2			5	1.5	1	1
NTA						2				
モノエタノールアミン								4	5	6
PAA					1	1.5	3			
AA-MA		3	3	5						
CMC	2									
PEG	5	2	2	2	2			1.5		
PVP							2			
蛍光染料	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.1	0.1	0.1
香料	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3	0.3	0.3
水	4	5	3	0.5	6	1	5	43.7	38.2	30.2
エタノール								5	5	5
プロピレングリコール								2	5	5
酵素	2	2	2	3	3	2	2	0.1	0.2	0.2
PC			3	3	10	3				
AC-1			2							
AC-2				1						
合計	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
形態	粒状	粒状	粒状	粒状	粒状	粒状	粒状	液状	液状	液状
使用濃度	20g/ 30L	20g/ 30L	20g/ 30L	20g/ 30L	20g/ 30L	20g/ 30L	20g/ 30L	20mL /30L	20mL /30L	20mL 30L

- LSA-2 : アルキルベンゼンスルホン酸 (アルキル鎖の炭素数10~14) を 48 %NaOHで中和したもの
- LAS-3 : アルキルベンゼンスルホン酸 (アルキル鎖の炭素数10~14) を 50 %KOHで中和したもの
- AS-2 : ドバノール25サルフェート ( $C_{12} \sim C_{15}$ 硫酸) のナトリウム塩
- SAS :  $C_{13} \sim C_{18}$ アルカンスルホン酸ナトリウム
- AOS : アルファオレフィンスルホン酸ナトリウム
- SFE : パーム油由来、アルファスルホ脂肪酸メチルエステルナトリウム
- 脂肪酸塩 : パルミチン酸ナトリウム
- AES-2 : ポリオキシエチレンアルキル ( $C_{12} \sim C_{15}$ ) エーテル硫酸ナトリウム (EO平均付加モル数2)
- AE-3 :  $C_{12} \sim C_{15}$ アルコールにEOを平均3モル付加したもの
- AE-4 :  $C_{12} \sim C_{15}$ アルコールにEOを平均7.2モル付加したもの
- AE-5 :  $C_{12} \sim C_{15}$ 2級アルコールにEOを平均7モル付加したもの
- AG : アルキル (ヤシ油由来) グルコシド (平均重合度1.5)
- 吸油性担体 : 非晶質アルミノ珪酸ソーダ、吸油能235mL/100g
- 結晶性珪酸塩 : SKS-6 ( $\delta$ - $Na_2Si_2O_5$ 、結晶性層状シリケート、平均粒子径20 $\mu$ m)
- 非晶質珪酸塩 : JIS 1号珪酸ナトリウム
- STPP : トリポリリン酸ナトリウム
- NTA : ニトリロトリ酢酸ナトリウム
- PAA : ポリアクリル酸ナトリウム、平均分子量12,000
- AA-MA : アクリル酸/マレイン酸共重合体
- CMC : カルボキシメチルセルロースナトリウム
- PEG : ポリエチレングリコール、平均分子量6,000
- PVP : ポリビニルピロリドン、平均分子量40,000、K値=26~35
- 蛍光染料 : チノパールCBSと、ホワイテックスSAを重量比1:1で配合したもの (注意: 液体洗剤の場合はチノパールCBSのみ配合)
- 香料 : 特開平8-239700号公報の実施例記載の香料組成を使用



酵素：リポラーゼ 100 T、ターマミル 60 T、及び KAC 500®（花王(株)製）を重量比率で 1 : 1 : 1 の割合で配合したもの

PC：過炭酸ソーダ、平均粒子径 400  $\mu$ m、メタホウ酸ソーダにて被覆したもの

AC-1：テトラアセチルエチレンジアミン

AC-2：ラウロイルオキシベンゼンスルホン酸ナトリウム

#### 実施例 8

表 10 に示す組成のうち、過炭酸ナトリウムと炭酸ナトリウム（デンス灰）を攪拌混合しながら、ポリアクリル酸ナトリウム 40 % 水溶液及び直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム又は非イオン性界面活性剤又はラウロイルオキシベンゼンスルホン酸ナトリウムを添加した。次いで実施例 7 で得られた *Bacillus* sp. KSM-KP43 由来のアルカリプロテアーゼ造粒物を添加し、全体的に均一になる程度に攪拌することにより、漂白剤を調製した。次いで、各漂白剤の 0.5 % 水溶液中に衾布を 20 °C、30 分間浸漬後、洗剤 A（実施例 6 参照）にてターゴトメーターで 100 rpm、10 分、20 °C で洗浄した。得られた漂白剤は優れた漂白力を有し、衣料用漂白剤として有用である。

表 1 0

(重量%)

成 分	本 発 明 品			
	14	15	16	17
過炭酸ナトリウム <sup>1)</sup>	80.0	80.0	80.0	80.0
炭酸ナトリウム (デンス灰)	16.0	12.0	16.0	12.0
陰イオン性界面活性剤 <sup>2)</sup>	2.0	2.0	—	—
非イオン性界面活性剤 <sup>3)</sup>	—	—	2.0	2.0
ポリアクリル酸ナトリウム <sup>4)</sup>	1.0	1.0	1.0	1.0
ラウロイルオキシベンゼン スルホン酸ナトリウム	—	4.0	—	4.0
<i>Bacillus</i> sp. KSM-KP43 アル カリプロテアーゼ (実施例 7)	1.0	1.0	1.0	1.0

1) 粒径 500～700  $\mu\text{m}$ 

2) 直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム (炭素数12～14)

3) ポリオキシエチレンアルキルエーテル (アルキル基の炭素数  
12～14、EO平均付加モル数12)

4) 平均分子量 8,000

## 実施例 9

表 1 1 に示す組成の自動食器洗浄機用洗浄剤組成物を実施例 8 と同様にして調製した。得られた自動食器洗浄機用洗浄剤組成物について、下記条件で洗浄力試験を行った。得られた洗浄剤は優れた洗浄力を有し、自動食器洗浄機用洗浄剤として有用である。

表 1 1

成 分	本 発 明 品			
	18	19	20	21
プルロニック L-61 <sup>1)</sup>	4	—	4	4
ソフタノール EP-7085 <sup>2)</sup>	—	4	—	—
クエン酸 3 ナトリウム	30	30	—	—
EDTA	—	—	30	—
トリポリリン酸ナトリウム	—	—	—	30
過炭酸ナトリウム	20	20	20	20
炭酸ナトリウム (デンス灰)	20	20	20	20
非晶質珪酸塩 <sup>3)</sup>	10	10	10	10
AA-MA <sup>4)</sup>	4	4	4	4
芒硝	10	10	10	10
リポラーゼ 100T® (ノボノルディスク社製)	0.5	0.5	0.5	0.5
ターマミル 60T® (ノボノルディスク社製)	1	1	1	1
<i>Bacillus</i> sp. KSM-KP43 アルカリ プロテアーゼ (実施例 7)	0.5	0.5	0.5	0.5

1) : ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン共重合体  
(平均分子量 2, 000)

2) : 炭素数 12~14 の sec-アルコールのエチレンオキサイド 7 モル、  
及びプロピレンオキサイド 8. 5 モル付加物

3) : J I S 2 号珪酸ナトリウム

4) : アクリル酸-マレイン酸共重合体

#### (1) 汚染皿の調製

直径 2.5 cm の磁器製の皿に一枚当たり 2.5 g の卵黄を刷毛で均一に塗布し、

115℃に温めた乾燥機中で60分乾燥させ、試験に供した。

## (2) 洗浄条件

使用洗浄機；松下電器(株)製全自動食器洗い機（機種NP-810）

洗浄；標準コース

洗浄用水；硬度62.3mgCaCO<sub>3</sub>/L（3.5°DH）の水

洗剤濃度；0.2重量%

## (3) 評価方法

汚染皿5枚を洗浄機に入れ、上記の洗浄条件にて実施例の洗浄剤組成物を用いて洗浄を行った。洗浄後の皿を1%エリトロシン溶液を用いて蛋白染色し、残留する蛋白汚れを肉眼判定した。

### 実施例10

表12に示す各成分を用い、自動食器洗浄機用洗浄剤組成物を得た。これらの自動食器洗浄機用洗浄剤組成物を用いて、実施例9と同様に洗浄力試験を行ったところ、いずれも優れた洗浄効果が得られた。

表 1 2

(重量%)

成 分		本 発 明 品				
		22	23	24	25	26
(a)	炭酸ナトリウム	30		30		50
	炭酸水素ナトリウム		25		25	
(b)	ソカランCP5 <sup>1)</sup>	5	6	5	5	5
(c)	過炭酸水素ナトリウム	5		6		
(d)	リモネン	2	2		1	1
	ソフタノールEP7045 <sup>2)</sup>			2	1	1
(c)	非晶性アルミノケイ酸ナトリウム (合成例1) <sup>3)</sup>	2		2	1	3
	非晶性アルミノケイ酸ナトリウム (合成例2) <sup>4)</sup>		2		1	
	リポラーゼ100T® (ノボルディスク社製)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
	ターマミル60T® (ノボルディスク社製)	1	1	1	1	1
	<i>Bacillus</i> sp. KSM-KP43 アルカリ プロテアーゼ (実施例7)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
	リンゴ酸ナトリウム		10		5	
	クエン酸ナトリウム	15		10	4	8
	硫酸ナトリウム	39	53	43	55	30

1) アクリル酸/マレイン酸共重合体BASF社製

2) 炭素数12~14のsec-アルコールのエチレンオキシド7モル、及び  
プロピレンオキシド4.5モル付加物

3. 4) 合成例は特開平6-179899号公報に記載

## 実施例 1 1

前記洗剤A (実施例6参照) に下記表13記載の配合量にて各種酵素を添加

し、実施例 6 と同様にしてワイシャツの衿部分を洗浄した。

表 1 3

(重量%)

酵 素	本 発 明 品						
	27	28	29	30	31	32	33
本発明品プロテアーゼ <sup>1)</sup>	—	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
従来プロテアーゼ <sup>2)</sup>	—	—	0.6	—	—	0.6	0.6
セルラーゼ <sup>3)</sup>	—	—	—	0.7	—	0.7	0.7
リパーゼ <sup>4)</sup>	—	—	—	—	0.5	—	0.5

1) 実施例 2 で得られた *Bacillus* sp. KSM-KP43 株由来の本発明プロテアーゼ精製標品から特開昭62-257990号公報に記載の方法に基づき調製した造粒物 (6 A P U / g)

2) 特開平5-25492号公報に記載のプロテアーゼK-16を特開昭62-257990号公報に記載の方法に基づき、5 A P U / g としたもの

3) KAC-500® (セルラーゼ、5 0 0 U / g、花王(株)製)

4) Lipolase 100T® (ノボノルディスク社製)

その結果、本発明プロテアーゼと従来プロテアーゼ、セルラーゼ、又はリパーゼとを組合わせて用いると洗浄効果がより向上する。

#### 産業上の利用可能性

本発明のアルカリプロテアーゼは、各種の界面活性剤に極めて安定であり、脂肪酸耐性を有し、かつ酸化剤にも高い安定性を有することから、漂白剤成分を含有する食器洗浄機用洗剤及び衣料用洗浄剤用の酵素として有用である。

## 請 求 の 範 囲

1. 下記の理化学的性質を有するアルカリプロテアーゼ。

(i) 作用pH範囲：

pH 4～13の広い範囲で作用し、pH 6～12で最適pH活性値の80%以上を示す。

(ii) 安定pH範囲：

40℃、30分の処理条件でpH 6～11の範囲で安定である。

(iii) 等電点：

8.9～9.1付近。

(iv) 脂肪酸の影響：

オレイン酸によってカゼイン分解活性の阻害を受けない。

2. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による推定分子量が約43000である請求項1記載のアルカリプロテアーゼ。

3. 配列番号1又は2で示されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の1若しくは2以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有するものである請求項1又は2記載のアルカリプロテアーゼ。

4. 請求項1～3のいずれか1項記載のアルカリプロテアーゼをコードする遺伝子。

5. 請求項1～3のいずれか1項記載のアルカリプロテアーゼを産生する微生物。

6. 請求項1～3のいずれか1項記載のアルカリプロテアーゼを含有する洗浄剤組成物。

図 1

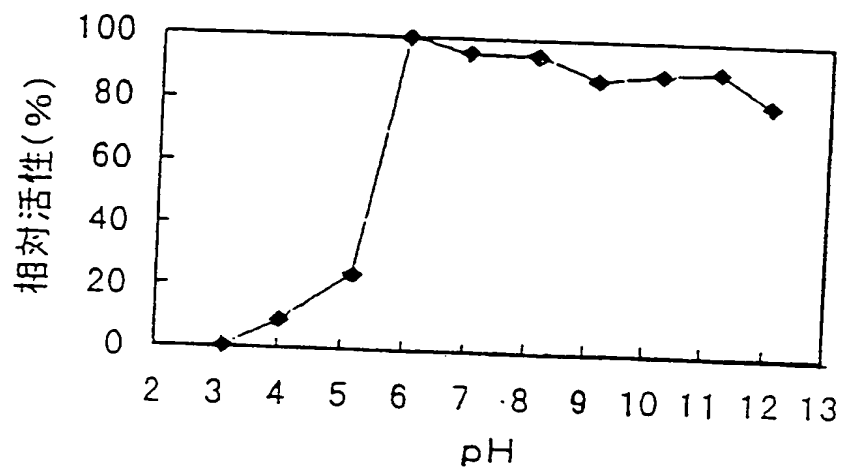


図 2

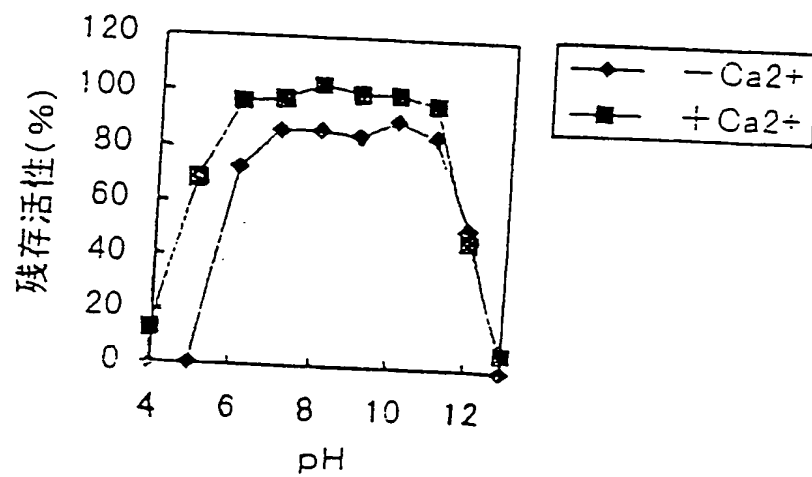




図 3

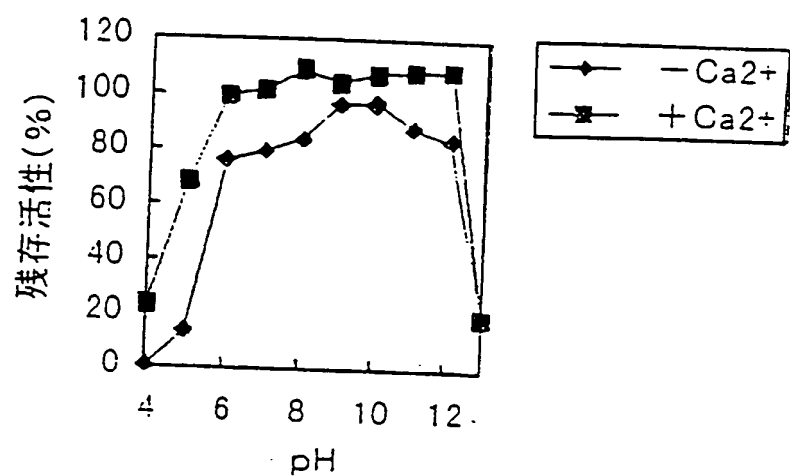


図 4

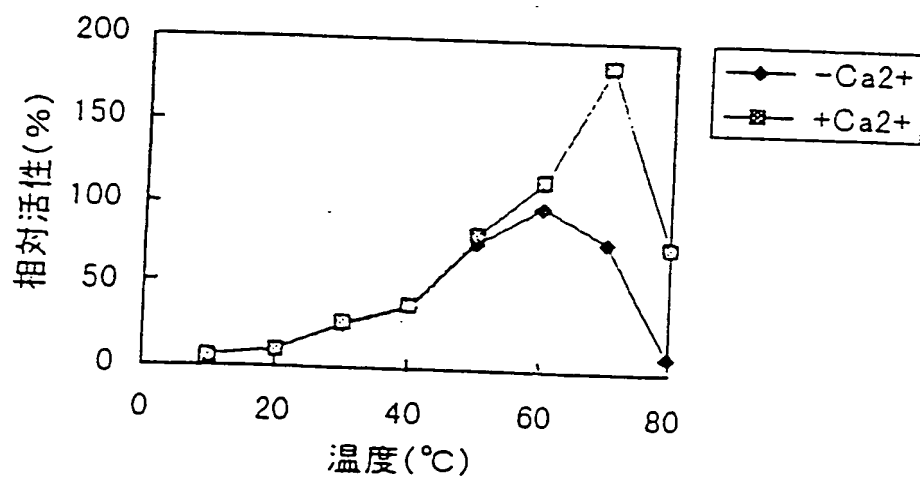


図 5

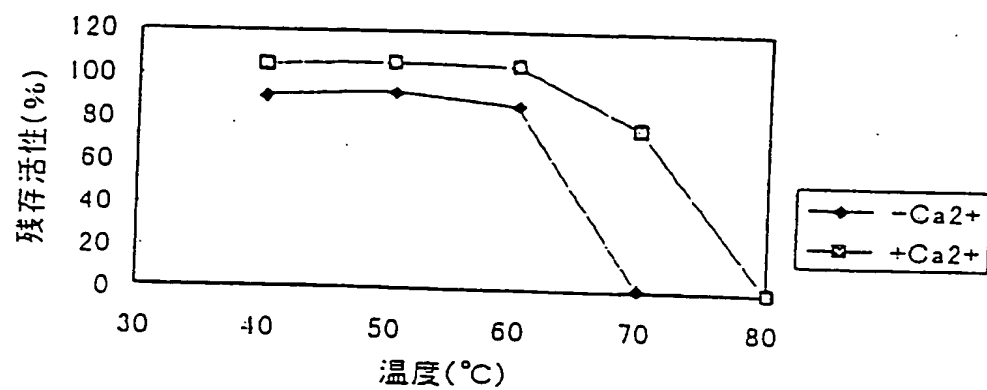
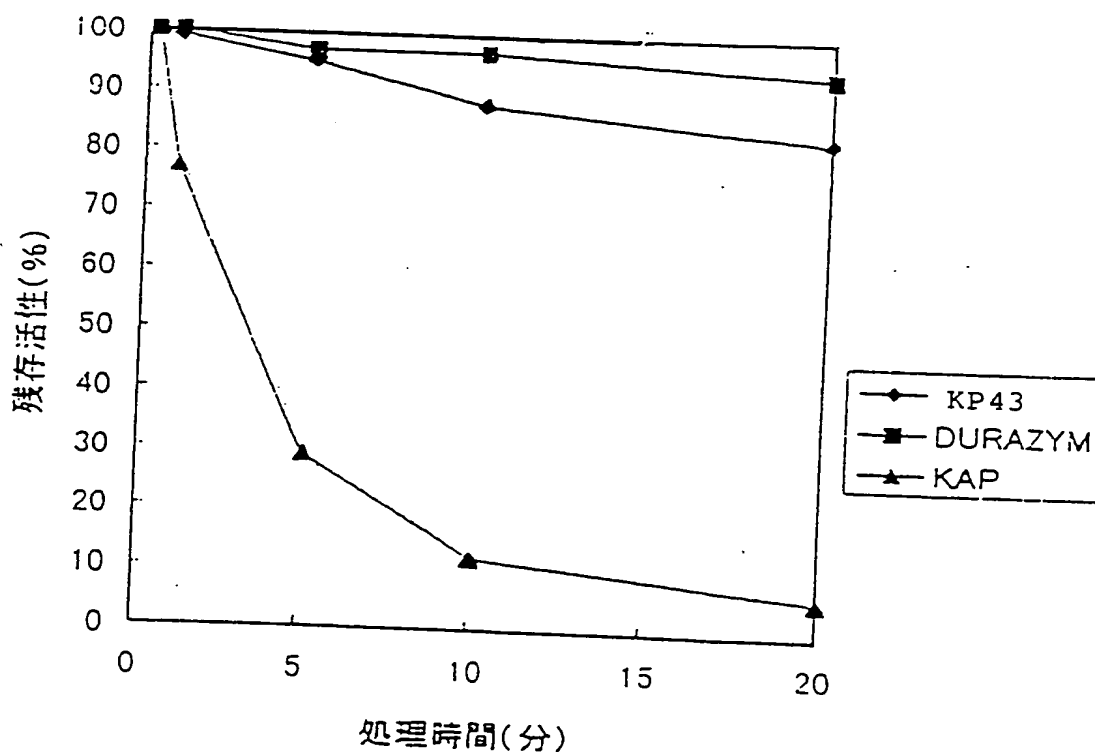


図 6



酸化剤(50mM 過酸化水素)に対する安定性

図 7

KP-9860プロテアーゼ N末端配列

15kDa部分分解物のN末端配列

18kDa部分分解物のN末端配列

25kDa部分分解物のN末端配列

28kDa部分分解物のN末端配列

NDVARHIVKADVAQSSYGLY

GIVKADVAQSSYGL

IKPDVMAPGTYYL

NAITVGATENLRPSFGSYAD

KNDMVILFAAGNEGPN

 8

9860-N2

I V K A D V A Q  
 5' ATT GTT AAA GCT GAT GTT GCT CAA 3'  
     C C G C C G C G  
     A A A A A A  
       G G G G

9860-18k-RV

TAT TTT GGT CTA CAT TAC CGT GG 5'  
 3' A C C G C C  
     G A A A  
       G G G

9860-18k

I K P D V M A P  
 5' ATT AAA CCT GAT GTT ATG GCT CC 3'  
     C G C C C C  
     A A A A  
       G G G

9860-25k-RV

TTA CGT TAT TGT CAT CCT CGT TGT 5'  
 3' G C A C C C C C  
     A G A A A A A  
     G G G G G

9860-25k

N A I T V G A T E N  
 5' ATT ACT GTT GGT GCT ACT GAA AA 3'  
     C C C C C C G  
     A A A A A A  
       G G G G G

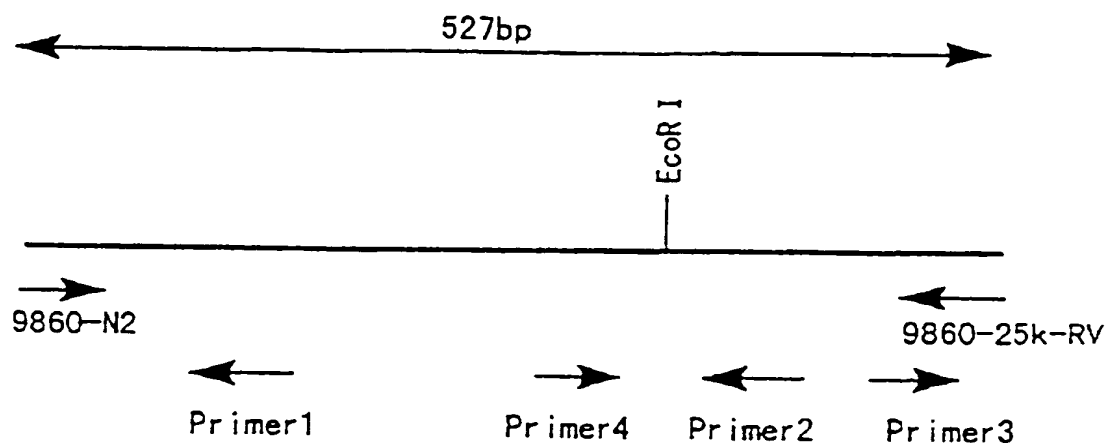
9860-28k-RV

TTA CTA TAC CAT TAT AAT AAA CG 5'  
 3' G G C A G C G  
     A G A  
     G G

9860-28k

N D M V I L F A  
 5' AAT GAT ATG GTT ATT TTT TTT GC 3'  
     C C C C C C  
     A A A  
     G G

9



Primer1 : TCGGCAACTGCGACAATCTGG

Primer2 : TCTGGAATCTGTCGTGTAGGC

Primer3 : AACGGCGGTACCATCAGTGC

Primer4 : GGAGGCTTGCCTTCCAATCTG

## 配列表

## SEQUENCE LISTING

- <110> KAO CORPORATION
- <120> Alkaline Protease
- <130> FP-KS-0498
- <150> JP 09-274570
- <151> 1997-10-07
- <160> 5
- <210> 1
- <211> 639
- <212> PRT
- <213> *Bacillus sp.*
- <220>
- <221> misc\_feature
- <222> 23, 29, 32, 46, 47, 53, 70, 74, 89, 102, 105, 128, 130, 131, 132, 133, 146,  
148, 160, 165, 172, 183, 187, 188, 189, 194, 286, 306, 324, 369, 431, 501,  
531, 541, 584, 591, 592, 594, 595, 596, 611, 632
- <223> Xaa=arbitraty amino acid
- <400>

Met Arg Lys Lys Lys Val Phe Leu Ser Val Leu Ser Ala Ala Ala Ile  
 1 5 10 15  
 Leu Ser Thr Val Ala Leu Xaa Asn Pro Ser Ala Gly Xaa Ala Arg Xaa  
 20 25 30  
 Phe Asp Leu Asp Phe Lys Gly Ile Gln Thr Thr Thr Asp Xaa Xaa Gly  
 35 40 45  
 Phe Ser Lys Gln Xaa Gln Thr Gly Ala Ala Ala Phe Leu Val Glu Ser  
 50 55 60  
 Glu Asn Val Lys Leu Xaa Lys Gly Leu Xaa Lys Lys Leu Glu Thr Val  
 65 70 75 80  
 Pro Ala Asn Asn Lys Leu His Ile Xaa Gln Phe Asn Gly Pro Ile Leu  
 85 90 95  
 Glu Glu Thr Lys Gln Xaa Leu Glu Xaa Thr Gly Ala Lys Ile Leu Asp  
 100 105 110  
 Tyr Ile Pro Asp Tyr Ala Tyr Ile Val Glu Tyr Glu Gly Asp Val Xaa  
 115 120 125  
 Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Ile Glu His Val Glu Ser Val Glu Pro Tyr Leu  
 130 135 140  
 Pro Xaa Tyr Xaa Ile Asp Pro Gln Leu Phe Thr Lys Gly Ala Ser Xaa  
 145 150 155 160  
 Leu Val Lys Ala Xaa Ala Leu Asp Thr Lys Gln Xaa Asn Lys Glu Val  
 165 170 175  
 Gln Leu Arg Gly Ile Glu Xaa Ile Ala Gln Xaa Xaa Xaa Ser Asn Asp  
 180 185 190  
 Val Xaa Tyr Ile Thr Ala Lys Pro Glu Tyr Lys Val Met Asn Asp Val  
 195 200 205

Ala Arg Gly Ile Val Lys Ala Asp Val Ala Gln Ser Ser Tyr Gly Leu  
210 215 220  
Tyr Gly Gln Gly Gln Ile Val Ala Val Ala Asp Thr Gly Leu Asp Thr  
225 230 235 240  
Gly Arg Asn Asp Ser Ser Met His Glu Ala Phe Arg Gly Lys Ile Thr  
245 250 255  
Ala Leu Tyr Ala Leu Gly Arg Thr Asn Asn Ala Asn Asp Thr Asn Gly  
260 265 270  
His Gly Thr His Val Ala Gly Ser Val Leu Gly Asn Gly Xaa Thr Asn  
275 280 285  
Lys Gly Met Ala Pro Gln Ala Asn Leu Val Phe Gln Ser Ile Met Asp  
290 295 300  
Ser Xaa Gly Gly Leu Gly Gly Leu Pro Ser Asn Leu Gln Thr Leu Phe  
305 310 315 320  
Ser Gln Ala Xaa Ser Ala Gly Ala Arg Ile His Thr Asn Ser Trp Gly  
325 330 335  
Ala Ala Val Asn Gly Ala Tyr Thr Thr Asp Ser Arg Asn Val Asp Asp  
340 345 350  
Tyr Val Arg Lys Asn Asp Met Thr Ile Leu Phe Ala Ala Gly Asn Glu  
355 360 365  
Xaa Pro Asn Gly Gly Thr Ile Ser Ala Pro Gly Thr Ala Lys Asn Ala  
370 375 380  
Ile Thr Val Gly Ala Thr Glu Asn Leu Arg Pro Ser Phe Gly Ser Tyr  
385 390 395 400  
Ala Asp Asn Ile Asn His Val Ala Gln Phe Ser Ser Arg Gly Pro Thr  
405 410 415



Lys Asp Gly Arg Ile Lys Pro Asp Val Met Ala Pro Gly Thr Xaa Ile  
 420 425 430  
 Leu Ser Ala Arg Ser Ser Leu Ala Pro Asp Ser Ser Phe Trp Ala Asn  
 435 440 445  
 His Asp Ser Lys Tyr Ala Tyr Met Gly Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro  
 450 455 460  
 Ile Val Ala Gly Asn Val Ala Gln Leu Arg Glu His Phe Val Lys Asn  
 465 470 475 480  
 Arg Gly Ile Thr Pro Lys Pro Ser Leu Leu Lys Ala Ala Leu Ile Ala  
 485 490 495  
 Gly Ala Ala Asp Xaa Gly Leu Gly Tyr Pro Asn Gly Asn Gln Gly Trp  
 500 505 510  
 Gly Arg Val Thr Leu Asp Lys Ser Leu Asn Val Ala Tyr Val Asn Glu  
 515 520 525  
 Ser Ser Xaa Leu Ser Thr Ser Gln Lys Ala Thr Tyr Xaa Phe Thr Ala  
 530 535 540  
 Thr Ala Gly Lys Pro Leu Lys Ile Ser Leu Val Trp Ser Asp Ala Pro  
 545 550 555 560  
 Ala Ser Thr Thr Ala Ser Val Thr Leu Val Asn Asp Leu Asp Leu Val  
 565 570 575  
 Ile Thr Ala Pro Asn Gly Thr Xaa Tyr Val Gly Asn Asp Phe Xaa Xaa  
 580 585 590  
 Pro Xaa Xaa Xaa Asn Trp Asp Gly Arg Asn Asn Val Glu Asn Val Phe  
 595 600 605  
 Ile Asn Xaa Pro Gln Ser Gly Thr Tyr Thr Ile Glu Val Gln Ala Tyr  
 610 615 620

Asn Val Pro Val Gly Pro Gln Xaa Phe Ser Leu Ala Ile Val Asn

625

630

635

<210> 2

<211> 640

<212> PRT

<213> *Bacillus sp.*

<220>

<221> misc\_\_feature

<222> 3, 24, 30, 33, 47, 48, 54, 71, 75, 90, 103, 106, 129, 131, 132, 133, 134, 147,  
149, 161, 166, 173, 184, 188, 189, 190, 195, 287, 307, 325, 370, 432, 502,  
532, 542, 585, 592, 593, 595, 596, 597, 612, 633

<223> Xaa=arbitrary amino acid

<400>

Met Arg Xaa Lys Lys Lys Val Phe Leu Ser Val Leu Ser Ala Ala Ala

1

5

10

15

Ile Leu Ser Thr Val Ala Leu Xaa Asn Pro Ser Ala Gly Xaa Ala Arg

20

25

30

Xaa Phe Asp Leu Asp Phe Lys Gly Ile Gln Thr Thr Thr Asp Xaa Xaa

35

40

45

Gly Phe Ser Lys Gln Xaa Gln Thr Gly Ala Ala Ala Phe Leu Val Glu

50

55

60

Ser Glu Asn Val Lys Leu Xaa Lys Gly Leu Xaa Lys Lys Leu Glu Thr

65

70

75

80

Val Pro Ala Asn Asn Lys Leu His Ile Xaa Gln Phe Asn Gly Pro Ile

85	90	95	
Leu Glu Glu Thr Lys Gln Xaa	Leu Glu Xaa Thr Gly Ala Lys	Ile Leu	
100	105	110	
Asp Tyr Ile Pro Asp Tyr Ala Tyr	Ile Val Glu Tyr Glu Gly	Asp Val	
115	120	125	
Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Ile	Glu His Val Glu Ser Val	Glu Pro Tyr	
130	135	140	
Leu Pro Xaa Tyr Xaa Ile Asp Pro	Gln Leu Phe Thr Lys Gly Ala	Ser	
145	150	155	160
Xaa Leu Val Lys Ala Xaa Ala Leu	Asp Thr Lys Gln Xaa Asn Lys	Glu	
165	170	175	
Val Gln Leu Arg Gly Ile Glu Xaa	Ile Ala Gln Xaa Xaa Xaa Ser	Asn	
180	185	190	
Asp Val Xaa Tyr Ile Thr Ala Lys	Pro Glu Tyr Lys Val Met Asn	Asp	
195	200	205	
Val Ala Arg Gly Ile Val Lys Ala	Asp Val Ala Gln Ser Ser Tyr	Gly	
210	215	220	
Leu Tyr Gly Gln Gly Gln Ile Val	Ala Val Ala Asp Thr Gly Leu	Asp	
225	230	235	240
Thr Gly Arg Asn Asp Ser Ser Met	His Glu Ala Phe Arg Gly Lys	Ile	
245	250	255	
Thr Ala Leu Tyr Ala Leu Gly Arg	Thr Asn Asn Ala Asn Asp Thr	Asn	
260	265	270	
Gly His Gly Thr His Val Ala Gly	Ser Val Leu Gly Asn Gly Xaa	Thr	
275	280	285	
Asn Lys Gly Met Ala Pro Gln Ala	Asn Leu Val Phe Gln Ser Ile	Met	

290	295	300	
Asp Ser Xaa Gly Gly Leu Gly Gly Leu Pro Ser Asn Leu Gln Thr Leu			
305	310	315	320
Phe Ser Gln Ala Xaa Ser Ala Gly Ala Arg Ile His Thr Asn Ser Trp			
	325	330	335
Gly Ala Ala Val Asn Gly Ala Tyr Thr Thr Asp Ser Arg Asn Val Asp			
	340	345	350
Asp Tyr Val Arg Lys Asn Asp Met Thr Ile Leu Phe Ala Ala Gly Asn			
	355	360	365
Glu Xaa Pro Asn Gly Gly Thr Ile Ser Ala Pro Gly Thr Ala Lys Asn			
	370	375	380
Ala Ile Thr Val Gly Ala Thr Glu Asn Leu Arg Pro Ser Phe Gly Ser			
385	390	395	400
Tyr Ala Asp Asn Ile Asn His Val Ala Gln Phe Ser Ser Arg Gly Pro			
	405	410	415
Thr Lys Asp Gly Arg Ile Lys Pro Asp Val Met Ala Pro Gly Thr Xaa			
	420	425	430
Ile Leu Ser Ala Arg Ser Ser Leu Ala Pro Asp Ser Ser Phe Trp Ala			
	435	440	445
Asn His Asp Ser Lys Tyr Ala Tyr Met Gly Gly Thr Ser Met Ala Thr			
	450	455	460
Pro Ile Val Ala Gly Asn Val Ala Gln Leu Arg Glu His Phe Val Lys			
465	470	475	480
Asn Arg Gly Ile Thr Pro Lys Pro Ser Leu Leu Lys Ala Ala Leu Ile			
	485	490	495
Ala Gly Ala Ala Asp Xaa Gly Leu Gly Tyr Pro Asn Gly Asn Gln Gly			

500                      505                      510  
 Trp Gly Arg Val Thr Leu Asp Lys Ser Leu Asn Val Ala Tyr Val Asn  
 515                      520                      525  
 Glu Ser Ser Xaa Leu Ser Thr Ser Gln Lys Ala Thr Tyr Xaa Phe Thr  
 530                      535                      540  
 Ala Thr Ala Gly Lys Pro Leu Lys Ile Ser Leu Val Trp Ser Asp Ala  
 545                      550                      555                      560  
 Pro Ala Ser Thr Thr Ala Ser Val Thr Leu Val Asn Asp Leu Asp Leu  
 565                      570                      575  
 Val Ile Thr Ala Pro Asn Gly Thr Xaa Tyr Val Gly Asn Asp Phe Xaa  
 580                      585                      590  
 Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Asn Trp Asp Gly Arg Asn Asn Val Glu Asn Val  
 595                      600                      605  
 Phe Ile Asn Xaa Pro Gln Ser Gly Thr Tyr Thr Ile Glu Val Gln Ala  
 610                      615                      620  
 Tyr Asn Val Pro Val Gly Pro Gln Xaa Phe Ser Leu Ala Ile Val Asn  
 625                      630                      635                      640

<210> 3

<211> 1920

<212> DNA

<213> *Bacillus sp.*

<400>

atg aga aag aag aag gtg ttt tta tct gtt tta tca gct gca gcg att -48  
 Met Arg Lys Lys Lys Val Phe Leu Ser Val Leu Ser Ala Ala Ala Ile

1	5	10	15	
ctg tcg act gtt gca tta aac aat ccc tcg gct ggt gat gca agg act	96			
Leu Ser Thr Val Ala Leu Asn Asn Pro Ser Ala Gly Asp Ala Arg Thr				
20	25	30		
ttt gat ctg gat ttt aaa gga att caa aca aca acc gat gtc agt ggt	144			
Phe Asp Leu Asp Phe Lys Gly Ile Gln Thr Thr Thr Asp Val Ser Gly				
35	40	45		
ttc tcc aaa cag cga caa aca ggt gcg gct gca ttt ctg gtg gag tct	192			
Phe Ser Lys Gln Arg Gln Thr Gly Ala Ala Ala Phe Leu Val Glu Ser				
50	55	60		
gaa aat gtg aaa ctt ctt aaa gga ttg cta aag aaa ctt gaa aca gta	240			
Glu Asn Val Lys Leu Leu Lys Gly Leu Leu Lys Lys Leu Glu Thr Val				
65	70	75	80	
ccg gca aat aat aaa ctc cat att gtc caa ttc aat ggc ccc att tta	288			
Pro Ala Asn Asn Lys Leu His Ile Val Gln Phe Asn Gly Pro Ile Leu				
85	90	95		
gaa gaa aca aaa cag aag cta gag aca act gga gca aag att ctc gac	336			
Glu Glu Thr Lys Gln Lys Leu Glu Thr Thr Gly Ala Lys Ile Leu Asp				
100	105	110		
tac atc cct gat tat gca tat att gtc gag tat gag ggg gat gtt cag	384			
Tyr Ile Pro Asp Tyr Ala Tyr Ile Val Glu Tyr Glu Gly Asp Val Gln				
115	120	125		
tca aaa gtc cgc tcc att gaa cac gtg gaa tca gtg gag cca tac ttg	432			
Ser Lys Val Arg Ser Ile Glu His Val Glu Ser Val Glu Pro Tyr Leu				
130	135	140		
ccg aaa tac aaa ata gat ccc cag ctt ttc aca aaa ggc gca tcg acg	480			

Pro Lys Tyr Lys Ile Asp Pro Gln Leu Phe Thr Lys Gly Ala Ser Thr  
 145 150 155 160  
 ctg gtg aaa gcg ttg gcg ctt gat acg aag cag aac aat aaa gaa gtg 528  
 Leu Val Lys Ala Leu Ala Leu Asp Thr Lys Gln Asn Asn Lys Glu Val  
 165 170 175  
 caa tta aga ggc atc gag gaa atc gct cag tac gta gca agc aat gac 576  
 Gln Leu Arg Gly Ile Glu Glu Ile Ala Gln Tyr Val Ala Ser Asn Asp  
 180 185 190  
 gtc cat tat att acg gca aag cct gaa tat aag gtg atg aat gat gtg 624  
 Val His Tyr Ile Thr Ala Lys Pro Glu Tyr Lys Val Met Asn Asp Val  
 195 200 205  
 gcc aga ggt att gtc aaa gcg gat gtg gca cag agc agc tac ggt ttg 672  
 Ala Arg Gly Ile Val Lys Ala Asp Val Ala Gln Ser Ser Tyr Gly Leu  
 210 215 220  
 tat gga caa ggc cag att gtc gca gtt gcc gat act gga ttg gat aca 720  
 Tyr Gly Gln Gly Gln Ile Val Ala Val Ala Asp Thr Gly Leu Asp Thr  
 225 230 235 240  
 gga aga aac gac agt tcg atg cat gaa gcc ttc cgc ggt aaa ata aca 768  
 Gly Arg Asn Asp Ser Ser Met His Glu Ala Phe Arg Gly Lys Ile Thr  
 245 250 255  
 gca cta tat gca ctg ggt cgg acg aat aat gcg aat gat acg aac ggt 816  
 Ala Leu Tyr Ala Leu Gly Arg Thr Asn Asn Ala Asn Asp Thr Asn Gly  
 260 265 270  
 cat ggt acc cat gtg gca ggt tcg gta tta gga aat ggc gca acg aat 864  
 His Gly Thr His Val Ala Gly Ser Val Leu Gly Asn Gly Ala Thr Asn  
 275 280 285

aaa gga atg gca cct caa gcg aat ctg gtt ttt caa tcc atc atg gat 912  
Lys Gly Met Ala Pro Gln Ala Asn Leu Val Phe Gln Ser Ile Met Asp  
290 295 300  
agc agt ggt ggg ctt gga ggc ttg cct tcc aat ctg caa acc tta ttc 960  
Ser Ser Gly Gly Leu Gly Gly Leu Pro Ser Asn Leu Gln Thr Leu Phe  
305 310 315 320  
agc caa gca ttc agt gca ggt gcc aga att cat aca aac tcc tgg ggg 1008  
Ser Gln Ala Phe Ser Ala Gly Ala Arg Ile His Thr Asn Ser Trp Gly  
325 330 335  
gca gcg gtg aat ggg gcc tac acg aca gat tcc aga aat gtg gat gac 1056  
Ala Ala Val Asn Gly Ala Tyr Thr Thr Asp Ser Arg Asn Val Asp Asp  
340 345 350  
tat gta agg aaa aat gat atg acg att ctt ttc gcg gct ggg aat gaa 1104  
Tyr Val Arg Lys Asn Asp Met Thr Ile Leu Phe Ala Ala Gly Asn Glu  
355 360 365  
agg ccg aac ggc ggt acc atc agt gca cct ggt acg gct aaa aac gcc 1152  
Arg Pro Asn Gly Gly Thr Ile Ser Ala Pro Gly Thr Ala Lys Asn Ala  
370 375 380  
ata aca gtc ggc gca acc gaa aac ctg cgt cca agc ttc ggt tcc tat 1200  
Ile Thr Val Gly Ala Thr Glu Asn Leu Arg Pro Ser Phe Gly Ser Tyr  
385 390 395 400  
gca gat aat att aac cac gtt gca cag ttc tct tcc cgt ggc ccg aca 1248  
Ala Asp Asn Ile Asn His Val Ala Gln Phe Ser Ser Arg Gly Pro Thr  
405 410 415  
aaa gat ggg cga atc aag cct gat gtc atg gcg cca ggg aca tac att 1296  
Lys Asp Gly Arg Ile Lys Pro Asp Val Met Ala Pro Gly Thr Tyr Ile



420 425 430  
tta tca gca aga tct tct ctt gca ccc gat tcc tcc ttc tgg gcg aat 1344  
Leu Ser Ala Arg Ser Ser Leu Ala Pro Asp Ser Ser Phe Trp Ala Asn  
435 440 445  
cat gac agc aaa tat gcc tat atg ggt gga acg tcc atg gca aca ccg 1392  
His Asp Ser Lys Tyr Ala Tyr Met Gly Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro  
450 455 460  
att gtt gcg ggg aat gtt gca cag ctc cgt gag cat ttt gtg aaa aat 1440  
Ile Val Ala Gly Asn Val Ala Gln Leu Arg Glu His Phe Val Lys Asn  
465 470 475 480  
aga gga atc act cct aag cct tcc cta ttg aaa gca gct ttg att gca 1488  
Arg Gly Ile Thr Pro Lys Pro Ser Leu Leu Lys Ala Ala Leu Ile Ala  
485 490 495  
ggg gct gct gat gtt gga ttg ggt tat ccg aac gga aac caa gga tgg 1536  
Gly Ala Ala Asp Val Gly Leu Gly Tyr Pro Asn Gly Asn Gln Gly Trp  
500 505 510  
ggc cga gtg acc ctg gat aaa tcg ttg aac gtt gcc tat gtg aac gaa 1584  
Gly Arg Val Thr Leu Asp Lys Ser Leu Asn Val Ala Tyr Val Asn Glu  
515 520 525  
tcc agt gcc cta tca act agc caa aaa gcg aca tat acc ttt act gca 1632  
Ser Ser Ala Leu Ser Thr Ser Gln Lys Ala Thr Tyr Thr Phe Thr Ala  
530 535 540  
acg gcg ggc aag cca ttg aaa atc tcc ctg gta tgg tcg gat gcc cct 1680  
Thr Ala Gly Lys Pro Leu Lys Ile Ser Leu Val Trp Ser Asp Ala Pro  
545 550 555 560  
gca agc act act gct tct gta acc ctg gtc aat gat ttg gat ttg gtc 1728

Ala Ser Thr Thr Ala Ser Val Thr Leu Val Asn Asp Leu Asp Leu Val

565

570

575

att aca gca cca aac gga aca aga tat gtc ggg aat gac ttc tca gca 1776

Ile Thr Ala Pro Asn Gly Thr Arg Tyr Val Gly Asn Asp Phe Ser Ala

580

585

590

cca ttt gac aat aac tgg gat ggc cgc aat aac gta gaa aat gta ttt 1824

Pro Phe Asp Asn Asn Trp Asp Gly Arg Asn Asn Val Glu Asn Val Phe

595

600

605

att aat tcg ccc caa agt gga aca tat acc att gag gtg caa gca tat 1872

Ile Asn Ser Pro Gln Ser Gly Thr Tyr Thr Ile Glu Val Gln Ala Tyr

610

615

620

aat gtg ccg gtt gga cca caa aac ttc tcg ttg gca att gtg aac taa 1920

Asn Val Pro Val Gly Pro Gln Asn Phe Ser Leu Ala Ile Val Asn

625

630

635

<210> 4

<211> 1923

<212> DNA

<213> *Bacillus sp.*

<400>

atg aga aag aag aaa aag gtg ttt tta tct gtt tta tca gct gca gcg 48

Met Arg Lys Lys Lys Lys Val Phe Leu Ser Val Leu Ser Ala Ala Ala

1

5

10

15

att ttg tcg act gtt gcg tta agt aat cca tct gca ggt ggt gca agg 96

Ile Leu Ser Thr Val Ala Leu Ser Asn Pro Ser Ala Gly Gly Ala Arg

20	25	30	
aat ttt gat ctg gat ttc aaa gga att cag aca aca act gat gct aaa			144
Asn Phe Asp Leu Asp Phe Lys Gly Ile Gln Thr Thr Thr Asp Ala Lys			
35	40	45	
ggg ttc tcc aag cag ggg cag act ggt gct gct gct ttt ctg gtg gaa			192
Gly Phe Ser Lys Gln Gly Gln Thr Gly Ala Ala Ala Phe Leu Val Glu			
50	55	60	
tct gaa aat gtg aaa ctc cca aaa ggt ttg cag aag aag ctt gaa aca			240
Ser Glu Asn Val Lys Leu Pro Lys Gly Leu Gln Lys Lys Leu Glu Thr			
65	70	75	80
gtc ccg gca aat aat aaa ctc cat att atc caa ttc aat gga cca att			288
Val Pro Ala Asn Asn Lys Leu His Ile Ile Gln Phe Asn Gly Pro Ile			
85	90	95	
tta gaa gaa aca aaa cag cag ctg gaa aaa aca ggg gca aag att ctc			336
Leu Glu Glu Thr Lys Gln Gln Leu Glu Lys Thr Gly Ala Lys Ile Leu			
100	105	110	
gac tac ata cct gat tat gct tac att gtc gag tat gag ggc gat gtt			384
Asp Tyr Ile Pro Asp Tyr Ala Tyr Ile Val Glu Tyr Glu Gly Asp Val			
115	120	125	
aag tca gca aca agc acc att gag cac gtg gaa tcc gtg gag cct tat			432
Lys Ser Ala Thr Ser Thr Ile Glu His Val Glu Ser Val Glu Pro Tyr			
130	135	140	
ttg ccg ata tac aga ata gat ccc cag ctt ttc aca aaa ggg gca tca			480
Leu Pro Ile Tyr Arg Ile Asp Pro Gln Leu Phe Thr Lys Gly Ala Ser			
145	150	155	160
gag ctt gta aaa gca gtg gcg ctt gat aca aag cag aaa aat aaa gag			528

Glu Leu Val Lys Ala Val Ala Leu Asp Thr Lys Gln Lys Asn Lys Glu  
                                 165                                170                                175  
 gtg caa tta aga ggc atc gaa caa atc gca caa ttc gca ata agc aat 576  
 Val Gln Leu Arg Gly Ile Glu Gln Ile Ala Gln Phe Ala Ile Ser Asn  
                                 180                                185                                190  
 gat gtg cta tat att acg gca aag cct gag tat aag gtg atg aat gat 624  
 Asp Val Leu Tyr Ile Thr Ala Lys Pro Glu Tyr Lys Val Met Asn Asp  
                                 195                                200                                205  
 gtt gcg cgt gga att gtc aaa gcg gat gtg gct cag agc agc tac ggg 672  
 Val Ala Arg Gly Ile Val Lys Ala Asp Val Ala Gln Ser Ser Tyr Gly  
                                 210                                215                                220  
 ttg tat gga caa gga cag atc gta gcg gtt gcc gat aca ggg ctt gat 720  
 Leu Tyr Gly Gln Gly Gln Ile Val Ala Val Ala Asp Thr Gly Leu Asp  
                                 225                                230                                235                                240  
 aca ggt cgc aat gac agt tcg atg cat gaa gcc ttc cgc ggg aaa att 768  
 Thr Gly Arg Asn Asp Ser Ser Met His Glu Ala Phe Arg Gly Lys Ile  
                                 245                                250                                255  
 act gca tta tat gca ttg gga cgg acg aat aat gcc aat gat acg aat 816  
 Thr Ala Leu Tyr Ala Leu Gly Arg Thr Asn Asn Ala Asn Asp Thr Asn  
                                 260                                265                                270  
 ggt cat ggt acg cat gtg gct ggc tcc gta tta gga aac ggc tcc act 864  
 Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Ser Val Leu Gly Asn Gly Ser Thr  
                                 275                                280                                285  
 aat aaa gga atg gcg cct cag gcg aat cta gtc ttc caa tct atc atg 912  
 Asn Lys Gly Met Ala Pro Gln Ala Asn Leu Val Phe Gln Ser Ile Met  
                                 290                                295                                300

gat agc ggt ggg gga ctt gga gga cta cct tcg aat ctg caa acc tta 960

Asp Ser Gly Gly Gly Leu Gly Gly Leu Pro Ser Asn Leu Gln Thr Leu

305 310 315 320

ttc agc caa gca tac agt gct ggt gcc aga att cat aca aac tcc tgg 1008

Phe Ser Gln Ala Tyr Ser Ala Gly Ala Arg Ile His Thr Asn Ser Trp

325 330 335

gga gca gca gtg aat ggg gct tac aca aca gat tcc aga aat gtg gat 1056

Gly Ala Ala Val Asn Gly Ala Tyr Thr Thr Asp Ser Arg Asn Val Asp

340 345 350

gac tat gtg cgc aaa aat gat atg acg atc ctt ttc gct gcc ggg aat 1104

Asp Tyr Val Arg Lys Asn Asp Met Thr Ile Leu Phe Ala Ala Gly Asn

355 360 365

gaa gga ccg aac ggc gga acc atc agt gca cca ggc aca gct aaa aat 1152

Glu Gly Pro Asn Gly Gly Thr Ile Ser Ala Pro Gly Thr Ala Lys Asn

370 375 380

gca ata aca gtc gga gct acg gaa aac ctc cgc cca agc ttt ggg tct 1200

Ala Ile Thr Val Gly Ala Thr Glu Asn Leu Arg Pro Ser Phe Gly Ser

385 390 395 400

tat gcg gac aat atc aac cat gtg gca cag ttc tct tca cgt gga ccg 1248

Tyr Ala Asp Asn Ile Asn His Val Ala Gln Phe Ser Ser Arg Gly Pro

405 410 415

aca aag gat gga cgg atc aaa ccg gat gtc atg gca ccg gga acg ttc 1296

Thr Lys Asp Gly Arg Ile Lys Pro Asp Val Met Ala Pro Gly Thr Phe

420 425 430

ata cta tca gca aga tct tct ctt gca ccg gat tcc tcc ttc tgg gcg 1344

Ile Leu Ser Ala Arg Ser Ser Leu Ala Pro Asp Ser Ser Phe Trp Ala

435 440 445  
aac cat gac agt aaa tat gca tac atg ggt gga acg tcc atg gct aca 1392  
Asn His Asp Ser Lys Tyr Ala Tyr Met Gly Gly Thr Ser Met Ala Thr  
450 455 460  
ccg atc gtt gct gga aac gtg gca cag ctt cgt gag cat ttt gtg aaa 1440  
Pro Ile Val Ala Gly Asn Val Ala Gln Leu Arg Glu His Phe Val Lys  
465 470 475 480  
aac aga ggc atc aca cca aag cct tct cta tta aaa gcg gca ctg att 1488  
Asn Arg Gly Ile Thr Pro Lys Pro Ser Leu Leu Lys Ala Ala Leu Ile  
485 490 495  
gcc ggt gca gct gac atc ggc ctt ggc tac ccg aac ggt aac caa gga 1536  
Ala Gly Ala Ala Asp Ile Gly Leu Gly Tyr Pro Asn Gly Asn Gln Gly  
500 505 510  
tgg gga cga gtg aca ttg gat aaa tcc ctg aac gtt gcc tat gtg aac 1584  
Trp Gly Arg Val Thr Leu Asp Lys Ser Leu Asn Val Ala Tyr Val Asn  
515 520 525  
gag tcc agt tct cta tcc acc agc caa aaa gcg acg tac tcg ttt act 1632  
Glu Ser Ser Ser Leu Ser Thr Ser Gln Lys Ala Thr Tyr Ser Phe Thr  
530 535 540  
gct act gcc ggc aag cct ttg aaa atc tcc ctg gta tgg tct gat gcc 1680  
Ala Thr Ala Gly Lys Pro Leu Lys Ile Ser Leu Val Trp Ser Asp Ala  
545 550 555 560  
cct gcg agc aca act gct tcc gta acg ctt gtc aat gat ctg gac ctt 1728  
Pro Ala Ser Thr Thr Ala Ser Val Thr Leu Val Asn Asp Leu Asp Leu  
565 570 575  
gtc att acc gct cca aat ggc aca cag tat gta gga aat gac ttt act 1776

Val	Ile	Thr	Ala	Pro	Asn	Gly	Thr	Gln	Tyr	Val	Gly	Asn	Asp	Phe	Thr
580							585						590		
tgc	cca	tac	aat	gat	aac	tgg	gat	ggc	cgc	aat	aac	gta	gaa	aat	gta
Ser	Pro	Tyr	Asn	Asp	Asn	Trp	Asp	Gly	Arg	Asn	Asn	Val	Glu	Asn	Val
595							600						605		
ttt	att	aat	gca	cca	caa	agc	ggg	acg	tat	aca	att	gag	gta	cag	gct
Phe	Ile	Asn	Ala	Pro	Gln	Ser	Gly	Thr	Tyr	Thr	Ile	Glu	Val	Gln	Ala
610							615						620		
tat	aac	gta	ccg	gtt	gga	cca	cag	acc	ttc	tgc	ttg	gca	att	gtg	aat
Tyr	Asn	Val	Pro	Val	Gly	Pro	Gln	Thr	Phe	Ser	Leu	Ala	Ile	Val	Asn
625							630						635		
													640		
taa													1923		

<210>	5
<211>	1923
<212>	DNA
<212>	<i>Bacillus</i> sp.

 $\langle 400 \rangle$ 

atg	aga	aag	aag	aaa	aag	gtg	ttt	tta	tct	gtt	tta	tca	gct	gca	gcg	48
Met	Arg	Lys	Lys	Lys	Lys	Val	Phe	Leu	Ser	Val	Leu	Ser	Ala	Ala	Ala	
				5						10					15	
att	ttg	tcg	act	gtt	gcg	tta	agt	aat	cca	tct	gca	ggt	ggt	gca	agg	96
Ile	Leu	Ser	Thr	Val	Ala	Leu	Ser	Asn	Pro	Ser	Ala	Gly	Gly	Ala	Arg	
				20						25				30		
aat	ttt	gat	ctg	gat	ttc	aaa	gga	att	cag	aca	aca	act	gat	gct	aaa	144

Asn Phe Asp Leu Asp Phe Lys Gly Ile Gln Thr Thr Thr Asp Ala Lys  
           35                          40                          45  
 ggt ttc tcc aag cag ggg cag act ggt gct gct gct ttt ctg gtg gaa 192  
 Gly Phe Ser Lys Gln Gly Gln Thr Gly Ala Ala Ala Phe Leu Val Glu  
           50                          55                          60  
 tct gaa aat gtg aaa ctc cca aaa ggt ttg cag aag aag ctt gaa aca 240  
 Ser Glu Asn Val Lys Leu Pro Lys Gly Leu Gln Lys Lys Leu Glu Thr  
           65                          70                          75                          80  
 gtc ccg gca aat aat aaa ctc cat att atc caa ttc aat gga cca att 288  
 Val Pro Ala Asn Asn Lys Leu His Ile Ile Gln Phe Asn Gly Pro Ile  
                                   85                                  90                                  95  
 tta gaa gaa aca aaa cag cag ctg gaa aaa aca ggg gca aag att ctc 336  
 Leu Glu Glu Thr Lys Gln Gln Leu Glu Lys Thr Gly Ala Lys Ile Leu  
                                   100                                  105                                  110  
 gac tac ata cct gat tat gct tac att gtc gag tat gag ggc gat gtt 384  
 Asp Tyr Ile Pro Asp Tyr Ala Tyr Ile Val Glu Tyr Glu Gly Asp Val  
                                   115                                  120                                  125  
 aag tca gca aca agc acc att gag cac gtg gaa tcc gtg gag cct tat 432  
 Lys Ser Ala Thr Ser Thr Ile Glu His Val Glu Ser Val Glu Pro Tyr  
                                   130                                  135                                  140  
 ttg ccg ata tac aga ata gat ccc cag ctt ttc aca aaa ggg gca tca 480  
 Leu Pro Ile Tyr Arg Ile Asp Pro Gln Leu Phe Thr Lys Gly Ala Ser  
                                   145                                  150                                  155                                  160  
 gag ctt gta aaa gca gtg gcg ctt gat aca aag cag aaa aat aaa gag 528  
 Glu Leu Val Lys Ala Val Ala Leu Asp Thr Lys Gln Lys Asn Lys Glu  
                                   165                                  170                                  175



gtg caa tta aga ggc atc gaa caa atc gca caa ttc gca ata agc aat 576

Val Gln Leu Arg Gly Ile Glu Gln Ile Ala Gln Phe Ala Ile Ser Asn

180

185

190

gat gtg cta tat att acg gca aag cct gag tat aag gtg atg aat gat 624

Asp Val Leu Tyr Ile Thr Ala Lys Pro Glu Tyr Lys Val Met Asn Asp

195

200

205

gtt gcg cgt gga att gtc aaa gcg gat gtg gct cag agc agc tac ggg 672

Val Ala Arg Gly Ile Val Lys Ala Asp Val Ala Gln Ser Ser Tyr Gly

210

215

220

ttg tat gga caa gga cag atc gta gcg gtt gcc gat aca ggg ctt gat 720

Leu Tyr Gly Gln Gly Gln Ile Val Ala Val Ala Asp Thr Gly Leu Asp

225

230

235

240

aca ggt cgc aat gac agt tcg atg cat gaa gcc ttc cgc ggg aaa att 768

Thr Gly Arg Asn Asp Ser Ser Met His Glu Ala Phe Arg Gly Lys Ile

245

250

255

act gca tta tat gca ttg gga cgg acg aat aat gcc aat gat acg aat 816

Thr Ala Leu Tyr Ala Leu Gly Arg Thr Asn Asn Ala Asn Asp Thr Asn

260

265

270

ggc cat ggt acg cat gtg gct ggc tcc gta tta gga aac ggc tcc act 864

Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Ser Val Leu Gly Asn Gly Ser Thr

275

280

285

aat aaa gga atg gcg cct cag gcg aat cta gtc ttc caa tct atc atg 912

Asn Lys Gly Met Ala Pro Gln Ala Asn Leu Val Phe Gln Ser Ile Met

290

295

300

gat agc ggt ggg gga ctt gga gga cta cct tcg aat ctg caa acc tta 960

Asp Ser Gly Gly Gly Leu Gly Gly Leu Pro Ser Asn Leu Gln Thr Leu

305                      310                      315                      320  
ttc agc caa gca tac agt gct ggt gcc aga att cat aca aac tcc tgg 1008  
Phe Ser Gln Ala Tyr Ser Ala Gly Ala Arg Ile His Thr Asn Ser Trp  
                         325                      330                      335  
gga gca gca gtg aat ggg gct tac aca aca gat tcc aga aat gtg gat 1056  
Gly Ala Ala Val Asn Gly Ala Tyr Thr Thr Asp Ser Arg Asn Val Asp  
                         340                      345                      350  
gac tat gtg cgc aaa aat gat atg acg atc ctt ttc gct gcc ggg aat 1104  
Asp Tyr Val Arg Lys Asn Asp Met Thr Ile Leu Phe Ala Ala Gly Asn  
                         355                      360                      365  
gaa gga ccg aac ggc gga acc atc agt gca cca ggc aca gct aaa aat 1152  
Glu Gly Pro Asn Gly Gly Thr Ile Ser Ala Pro Gly Thr Ala Lys Asn  
                         370                      375                      380  
gca aia aca gtc gga gct acg gaa aac ctc cgc cca agc ttt ggg tct 1200  
Ala Ile Thr Val Gly Ala Thr Glu Asn Leu Arg Pro Ser Phe Gly Ser  
385                      390                      395                      400  
tat gcg gac aat atc aac cat gtg gca cag ttc tct tca cgt gga ccg 1248  
Tyr Ala Asp Asn Ile Asn His Val Ala Gln Phe Ser Ser Arg Gly Pro  
                         405                      410                      415  
aca aag gat gga cgg atc aaa ccg gat gtc atg gca ccg gga acg ttc 1296  
Thr Lys Asp Gly Arg Ile Lys Pro Asp Val Met Ala Pro Gly Thr Phe  
                         420                      425                      430  
ata cta tca gca aga tct tct ctt gca ccg gat tcc tcc ttc tgg gcg 1344  
Ile Leu Ser Ala Arg Ser Ser Leu Ala Pro Asp Ser Ser Phe Trp Ala  
                         435                      440                      445  
aac cat gac agt aaa tat gca tac atg ggt gga acg tcc atg gct aca 1392

Asn His Asp Ser Lys Tyr Ala Tyr Met Gly Gly Thr Ser Met Ala Thr  
 450 455 460  
 ccg atc gtt gct gga aac gtg gca cag ctt cgt gag cat ttt gtg aaa 1440  
 Pro Ile Val Ala Gly Asn Val Ala Gln Leu Arg Glu His Phe Val Lys  
 465 470 475 480  
 aac aga ggc atc aca cca aag cct tct cta tta aaa gcg gca ctg att 1488  
 Asn Arg Gly Ile Thr Pro Lys Pro Ser Leu Leu Lys Ala Ala Leu Ile  
 485 490 495  
 gcc ggt gca gct gac atc ggc ctt ggc tac ccg aac ggt aac caa gga 1536  
 Ala Gly Ala Ala Asp Ile Gly Leu Gly Tyr Pro Asn Gly Asn Gln Gly  
 500 505 510  
 tgg gga cga gtg aca ttg gat aaa tcc ctg aac gtt gcc tat gtg aac 1584  
 Trp Gly Arg Val Thr Leu Asp Lys Ser Leu Asn Val Ala Tyr Val Asn  
 515 520 525  
 gag tcc agt tct cta tcc acc agc caa aaa gcg acg tac tcg ttt act 1632  
 Glu Ser Ser Ser Leu Ser Thr Ser Gln Lys Ala Thr Tyr Ser Phe Thr  
 530 535 540  
 gct act gcc ggc aag cct ttg aaa atc tcc ctg gta tgg tct gat gcc 1680  
 Ala Thr Ala Gly Lys Pro Leu Lys Ile Ser Leu Val Trp Ser Asp Ala  
 545 550 555 560  
 cct gcg agc aca act gct tcc gta acg ctt gtc aat gat ctg gac ctt 1728  
 Pro Ala Ser Thr Thr Ala Ser Val Thr Leu Val Asn Asp Leu Asp Leu  
 565 570 575  
 gtc att acc gct cca aat ggc aca cag tat gta gga aat gac ttt act 1776  
 Val Ile Thr Ala Pro Asn Gly Thr Gln Tyr Val Gly Asn Asp Phe Thr  
 580 585 590

tcg cca tac aat gat aac tgg gat ggc cgc aat aac gta gaa aat gta 1824

Ser Pro Tyr Asn Asp Asn Trp Asp Gly Arg Asn Asn Val Glu Asn Val

595

600

605

ttt att aat gca cca caa agc ggg acg tat aca att gaa gta cag gct 1872

Phe Ile Asn Ala Pro Gln Ser Gly Thr Tyr Thr Ile Glu Val Gln Ala

610

615

620

tat aac gta ccg gtt gga cca cag aac ttc tcg ttg gca att gtg aat 1920

Tyr Asn Val Pro Val Gly Pro Gln Asn Phe Ser Leu Ala Ile Val Asn

625

630

635

640

taa

1923

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/04528

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/57, C12N9/54, C12N1/21, C11D3/386

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/57, C12N9/54, C12N1/21, C11D3/386

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), GenSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 4-197182, A (Lion Corp.), 16 July, 1992 (16. 07. 92) (Family: none)	1-6
A	JP, 6-70765, A (Showa Denko K.K.), 15 March, 1994 (15. 03. 94) (Family: none)	1-6
A	JP, 9-121855, A (TOTO Ltd.), 13 May, 1997 (13. 05. 97) (Family: none)	1-6
A	JP, 5-211868, A (Hokkaido Sugar Co., Ltd.), 24 August, 1993 (24. 08. 93) (Family: none)	1-6
A	JP, 9-121856, A (Kao Corp.), 13 May, 1997 (13. 05. 97) (Family: none)	1-6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
16 December, 1998 (16. 12. 98)Date of mailing of the international search report  
22 December, 1998 (22. 12. 98)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>+</sup> C12N 15/57, C12N 9/54, C12N 1/21, C11D 3/386

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>+</sup> C12N 15/57, C12N 9/54, C12N 1/21, C11D 3/386

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG), GenSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 4-197182, A(ライオン株式会社) 16. 7月. 1992(16. 07. 92) ファミリーなし	1-6
A	JP, 6-70765, A(昭和電工株式会社) 15. 3月. 1994(15. 03. 94) ファミリーなし	1-6
A	JP, 9-121855, A(東陶機器株式会社) 13. 5月. 1997(13. 05. 97) ファミリーなし	1-6
A	JP, 5-211868, A(北海道糖業株式会社) 24. 8. 1993(24. 08. 93) ファミリーなし	1-6

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16. 12. 98

国際調査報告の発送日

22.12.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富永 みどり

4B

9152

電話番号 03-3581-1101 内線 3449